

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Roland Moll
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

*Molekulare Identifizierung einer neuen Variante des desmo-
somen Plaqueproteins PKP3 und deren Charakterisierung
in normalem und pathologischem humanen Gewebe*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanme-
dizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Mario Mühmer aus Clausthal-Zellerfeld
Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 15.05.2014.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Moll

Korreferent: Herr Prof. Dr. G. Schratt

Meinen Eltern

*„Wissenschaft: Es ist nicht ihr Ziel, der unendlichen
Weisheit eine Tür zu öffnen, sondern eine Grenze zu set-
zen dem unendlichen Irrtum.“*

Bertolt Brecht

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Zell-Zell-Verbindungen	1
1.2 Desmosomen	2
1.3 Plakophiline	6
1.3.1 Plakophilin 1	7
1.3.2 Plakophilin 2	8
1.3.3 Plakophilin 3	9
1.3.4 Plakophilin 3 und Tumoren	10
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material	14
2.1 Geräte	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Kits	15
2.4 Chemikalien	16
2.5 Biologisches Material	18
2.5.1 Untersuchungsmaterial	18
2.5.2 Zelllinien	19
2.5.3 Plasmidvektoren und Bakterienstämme	19
2.5.4 Versuchstiere für Generierung polyklonaler Antikörper	19
2.6 Antikörper	20
2.6.1 Primärantikörper	20
2.6.2 Sekundärantikörper	20
2.7 <i>Primer</i>	21
2.8 Enzyme	21
2.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	21
3 Methoden	24

3.1	Kultivierung eukaryoter Zellen	24
3.1.1	Einfrieren und Auftauen der Zellen	24
3.1.2	Kultivierung der Zelllinien.....	24
3.1.3	Fixierung von Zellen/ Geweben.....	25
3.1.3.1	Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenz	25
3.1.3.2	Fixierung von Geweben für die Immunfluoreszenz	25
3.2	Nukleinsäuretechniken	26
3.2.1	RNA-Isolierung aus Zellen	26
3.2.2	mRNA-Isolierung aus Zellen	26
3.2.3	Reverse Transkription von Gesamt-RNA / mRNA	27
3.2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	27
3.2.5	<i>5'-Rapid amplification of cDNA ends</i> nach Shi und Jarvis.....	29
3.2.5.1	Synthese der cDNA	29
3.2.5.2	Ligation des Adapters:.....	30
3.2.5.3	PCR Amplifikation	30
3.2.6	Agarosegel.....	33
3.2.6.1	Aufreinigung von DNA aus Agarosegel.....	34
3.2.7	DNA-Klonierung.....	35
3.2.7.1	Restriktionsverdau	35
3.2.7.2	Dephosphorylierung.....	36
3.2.7.3	<i>A-Tailing</i>	36
3.2.7.4	<i>End-Filling</i>	37
3.2.7.5	Ligation.....	37
3.2.8	Transformation.....	38
3.2.8.1	Chemische Transformation.....	38
3.2.8.2	Elektrotransformation	39
3.2.9	Transfektion von Säugerzellen.....	40
3.2.10	Präparation von Plasmid-DNA	40
3.2.10.1	Maxipräparation.....	42

3.3	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	42
3.3.1	Herstellung der Oligopeptide	43
3.3.2	Immunisierung	43
3.4	Proteintechniken	44
3.4.1	Proteinmessung	44
3.4.2	SDS-PAGE/ Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese	44
3.4.3	Protein-Blot (<i>Western Blot</i>).....	47
3.4.3.1	Ponceau S-Färbung	48
3.4.3.2	Immunoblotting / Immunbiochemischer-Nachweis	48
3.4.3.3	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> Immunreaktion zur Detektion von Proteinen	48
3.5	Immunfluoreszenz	49
3.6	Immunhistochemie	50
3.7	Bildbearbeitung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Identifizierung möglicher Varianten von PKP3	52
4.1.1	Sequenzsuche in öffentlichen Datenbanken.....	52
4.1.2	Nachweis der mRNA einer Variante des PKP3-Gens	54
4.1.3	Erweiterung des 5'-Bereichs der PKP3b-mRNA.....	58
4.2	Proteinexpressionsanalysen der Variante PKP3b.....	64
4.2.1	Herstellung des cDNA-Klons von PKP3b für die stabile Transfektion von PLC-Zellen.	64
4.2.2	Herstellung von polyklonalen Antiseren für PKP3a und b.....	66
4.2.3	<i>Western Blot</i> -Analysen der Plakophilin-Varianten PKP3a und 3b. 67	
4.2.4	Immunfluoreszenzanalysen der Plakophilin 3-Varianten a / b	69
4.2.4.1	Spezifität der polyklonalen Antiseren in der Immunfluoreszenz	69
4.2.4.2	Expressionsnachweis von PKP3b in verschiedenen Zelllinien 72	
4.2.4.3	Expressionsnachweis des PKP3a und PKP3b in Gewebe	79

4.2.5	Immunhistochemische Analyse der Plakophilin 3-Varianten a und b in Paraffin-eingebetteten Geweben	83
5	Diskussion	85
5.1	Identifizierung weiterer Varianten von PKP3	86
5.1.1	Sequenzsuche in öffentlichen Datenbanken.....	86
5.1.2	Nachweis der neuen Variante.....	87
5.1.3	Erweiterung des 5'-Bereichs der PKP3b-mRNA.....	87
5.2	Proteinexpressionsanalysen der Variante PKP3b.....	89
5.3	Ausblick.....	93
6	Zusammenfassung.....	98
7	Summary	100
8	Literaturverzeichnis.....	102
9	Verzeichnis der akademischen Lehrer	108
10	Danksagung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>knock out</i>
A	Adenin
AA	<i>amino acid</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
A _{260/280}	Absorption bei entsprechender Wellenlänge
Ak	Antikörper
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ARVCF	<i>Armadillo Repeat Protein deleted in Velo-cardio-facial Syndrome</i>
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	<i>antisense</i> -Adapter
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cytosin
C/EBP	<i>CAAAT/ Enhancer-Binding Protein</i>
C-TAK	<i>CDC25C-Associated Protein Kinase 1</i>
C-terminal	carboxy-terminal
Ca ²⁺	Calcium
CDC25C	<i>Cell Division Cycle 25 Homolog C</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTN	Catenin
(k)Da	(kilo)Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMP	Dimethyl-Pimelimidat-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DSP	Desmoplakin
DTT	Dithiothreitol
E6,5	embryonaler Entwicklungstag 6,5 der Maus
EDSF	<i>Ectodermal Dysplasia/Skin Fragility</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF	eukaryotischer Translationselongationsfaktor
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FKS	Fötales Kälberserum
Fw-Primer	<i>forward-Primer</i>
FXR1	<i>Fragile-X-Related Protein</i>
G	Guanin
G3BP	<i>Ras-GAP-SH3-Binding Protein</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR2	<i>Homology Region 2</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HSF2	<i>Heat Shock Factor 2</i>
IF	Intermediärfilament
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JUP	junktionales Plakoglobin
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KLH	<i>Keyhole-Limpet Hemocyanine</i>

LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n.a.	nicht angegeben
N-terminal	amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NPRAP	<i>Neural Plakophilin-Related Arm-repeat Protein</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom
PABC	<i>Poly(A)-Binding Protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PAR	<i>Pulmonary Adenoma Resistance</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	isoionischer Punkt
pI	isoelektrischer Punkt
PKC	Proteinkinase C
PKP	Plakophilin
RACK1	<i>Receptor of Activated Protein Kinase C 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPC	<i>RNA polymerase III Subunit C</i>
rpm	Umdrehungen / Minute
RPS2	ribosomales Protein S2
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Rv-Primer	<i>reverse-Primer</i>
SA	<i>sense-Adapter</i>

SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS(T)-Puffer	<i>Tris Buffered Saline</i> (+ Tween 20)-Puffer
TE-Puffer	Tris, EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer
U	Uracil
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen- % / Volumen- %
w/v	Massen- % / Volumen- %
ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZO	<i>Zonula occludens</i>

1 Einleitung

1.1 Zell-Zell-Verbindungen

Der menschliche Körper als mehrzelliger Organismus ist unterteilt in verschiedene Organe und Gewebearten, welche in Verbänden einzelner Zelltypen organisiert sind. Um innerhalb eines distinkten Gewebes Morphologie, Differenzierung, Aufrechterhaltung und Organisation der Zellverbände zu gewährleisten, sind Zell-Zell-Verbindungen unentbehrlich. Diese halten die Komplexität des Gesamtorganismus durch Verankerung, Vernetzung, aber auch Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen aufrecht.

Zell-Zell-Verbindungen lassen sich morphologisch und funktionell in 3 Klassen einteilen [25, 66]. Sogenannte *tight junctions* (*Zonulae occludentes*) gehören zur Klasse der Verschlusskontakte [66]. Sie trennen die apikalen Bereiche polarisierter Zellen von den basolateralen durch enge Annäherung der Plasmamembranen benachbarter Zellen. Dadurch wird parazelluläre Diffusion fast komplett verhindert, während gleichzeitig ein gerichteter, selektiver Ionentransport entlang der Membranen ermöglicht wird [2]. Die dabei entstehende Barriere ist essentiell für die Ausbildung und den Erhalt epithelialer und endothelialer Zellverbände. *Tight junctions* werden aus den transmembranen Adhäsionsproteinen Occludin und den Claudinen gebildet, welche die Aktinfilamente des Zytoskeletts über intrazelluläre Proteine wie ZO-1 bis ZO-3, PAR3, PAR6 und Cingulin binden [70].

Die zweite Klasse der Zell-Zell-Verbindungen sind sogenannte *gap junctions* (Nexus), die als Kommunikationskontakte fungieren [61]. Sie sind nicht auf endotheliale bzw. epitheliale Zellverbände beschränkt, sondern finden sich auch in glatten Muskelzellen, Nervenzellen, Herzmuskelzellen und embryonalen Zellen. Sie werden aus 6 Monomeren (Connexine) zu einem membranständigen Hexamer (Connexon) gebildet, welches mit einem Connexon der benachbarten Zelle einen interzellulären wassergefüllten Kanal bildet. Dabei verschmelzen die Plasmamembranen nicht, sondern nähern sich auf 2 – 4 nm an und ermöglichen die Passage von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 1,5 kDa. Somit können in kürzester Zeit sowohl Ionen als auch *second messenger* und diverse Metabolite zwischen zwei benachbarten Zellen ausgetauscht werden, welches eine elektrische und bio-

chemische Kopplung und Synchronisation von ganzen Zellverbänden ermöglicht [102, 105]. Die Anzahl der Connexone innerhalb einer *gap junction* variiert zwischen einzelnen bis mehreren hundert Stück [61].

In der dritten Klasse werden die Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Verbindungen zusammengefasst. Zu ihnen werden die Mikrofilament-assoziierten *adherens junctions* (*Zonulae adhaerentes*) und die Intermediärfilament-verankernden Desmosomen (*Macula adhaerens*) gezählt. Diese Verbindungstypen weisen eine homologe Struktur auf und zeichnen sich durch eine Ca^{2+} -Abhängigkeit ihrer Transmembranproteine (Cadherine) aus, welche die Adhäsion benachbarter Zellen vermitteln [13]. Sowohl bei den *adherens junctions* als auch bei den Intermediärfilament-verankerten Desmosomen findet sich ein elektronenmikroskopisch sichtbarer Plaque, welcher sich aus peripheren Proteinen zusammensetzt und die jeweiligen Zytoskelett-Filamente verbindet [103]. Klassische Cadherine wie E-, N-, P-Cadherine sind die aufbauenden Proteine der *adherens junctions* [73]. Jene Glykoproteine vermitteln die Adhärenz der Zellen über homophile Bindungen ihrer extrazellulären Domänen. Dazu benötigen sie Ca^{2+} -Ionen, welche ihre extrazellulären Domänen stabilisieren. Intrazellulär binden sie α -, β -, γ -Catenin und weitere Proteine, welche die Verankerung der Aktin-Mikrofilamente vermitteln [73].

Ihre Funktion ist mannigfaltig und trägt sowohl zur Polarität als auch zur mechanischen Stabilität und zellulären Bewegungen in unterschiedlichen Geweben einen entscheidenden Anteil bei. Desgleichen ist die Embryo- und Organogenese ohne diese Zell-Zell-Verbindungen nicht möglich [97]. Einige Moleküle beteiligen sich sogar entscheidend an Entwicklung und Metastasierung von Tumorgeweben [7, 14].

1.2 Desmosomen

Anders als die oben bereits beschriebenen *adherens junctions* binden Desmosomen Intermediärfilamente des Zytoskeletts. Diese Tatsache prädestiniert sie für Gewebe, die hohem mechanischen Stress ausgesetzt sind. Dazu zählen vor allem die Epidermis, der Herzmuskel und das Darmepithel. Dabei handelt es sich nicht um rein statische Strukturen, sondern höchst dynamische Verbindungen, welche

sich den gegebenen Umweltbedingungen anpassen, um die zellspezifische Funktion der Gewebe zu sichern [31].

Desmosomen kommen sowohl in allen Epithelien als auch einigen nicht-epithelialen Zellverbänden, z.B. des Myokards, dendritischen Retikulumzellen der Lymphknoten-Follikel oder Zellen der Meningen vor [18, 50, 80]. Sie stellen strukturell scheibenförmige Interzellularkontakte mit einem Durchmesser von 10 nm (Abb. 1-1) dar. Der Kontakt zweier benachbarter Zellen wird als Desmosom bezeichnet. Auch hier finden sich Transmembranproteine, die sogenannten nicht-klassischen oder auch desmosomalen Cadherine Desmoglein (DSG) und Desmocollin (DSC), welche ebenfalls Ca^{2+} -abhängig sind. Bisher wurden im Menschen vier Subtypen des DSG und drei des DSC identifiziert [23]. Ihre jeweiligen zytoplasmatischen Domänen bilden zusammen mit peripheren Proteinen den oben beschriebenen elektronendichten desmosomalen Plaque. Hierin findet sich Plakoglobin (auch als γ -Catenin bekannt), ein Vertreter der *armadillo*-Proteinfamilie, welcher Ähnlichkeiten mit dem β -Catenin der *adherens junctions* besitzt. Weiterhin zählen zu den Plaque-Proteinen das Desmoplakin aus der Plakin-Familie und die Plakophiline, welche ebenfalls zu den *armadillo*-Proteinen gezählt werden [20, 36]. Desmoplakin dient als Anker für die Intermediärfilamente, während Plakoglobin und die Plakophiline vermutlich als Brückenproteine zwischen dem Desmoglein bzw. Desmocollin und dem Desmoplakin fungieren [31]. Die Zusammensetzung der Desmosomen variiert allerdings bezüglich der Transmembranproteine in Abhängigkeit von Zelltyp und Differenzierungsgrad [23, 48]. So sind DSG2 und DSC2 in allen Desmosomen-bildenden Zelltypen zu finden [49], während die anderen Subtypen differenzierungsabhängig in verschiedenen mehrschichtigen Epithelien zu finden sind [68, 78]. Auch Desmoplakin und Plakoglobin kommen konstitutiv in allen Desmosomen vor, wohingegen die einzelnen Plakophiline wiederum differenzierungsabhängig integriert werden [81].

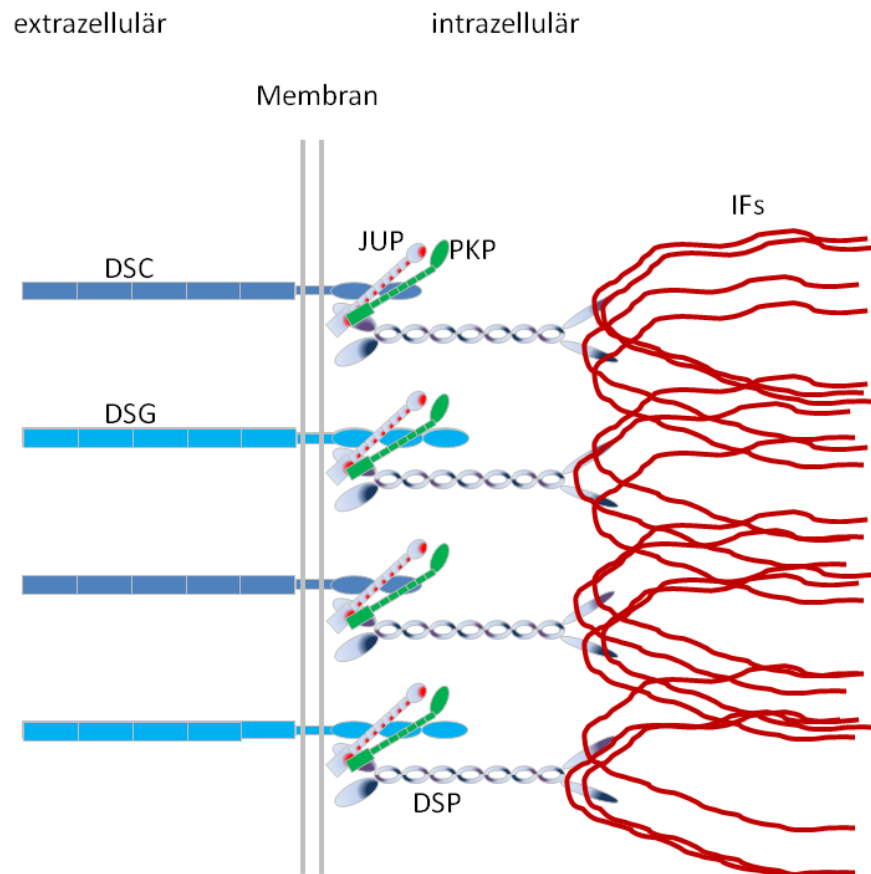


Abb. 1-1 Schematischer Aufbau eines halben Desmosoms

Desmosomen sind aus zwei symmetrisch aufgebauten Hälften zusammengesetzt. Benachbarte Zellen steuern je eine Hälfte bei. Für die extrazelluläre Assoziation sind das homotypisch bindende Desmocollin (DSC) und Desmoglein (DSG) verantwortlich. Intrazellulär sorgen diese beiden Transmembranproteine indirekt für die Verankerung der Intermediärfilamente (IFs). Dazu rekrutieren sie Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (JUP). PKP und JUP binden dann N-terminal Desmoplakin (DSP), welches direkt über seinen C-Terminus die Intermediärfilamente wie Desmin, Keratin und Vimentin verankert.

Experimente im Tiermodell und Krankheiten beim Menschen, welche mit Fehlfunktionen der desmosomalen Proteine assoziiert sind, zeigen, wie bedeutend Desmosomen für die Stabilität von Zellverbänden im adulten Gewebe, aber auch in der Embryonalentwicklung sind [31]. Gallicano et al. [27-28] zeigten, dass es in Desmoplakin $-/-$ Mäusen aufgrund verringerter Desmosomenzahl und zusätzlich unzureichender Verbindung mit dem Zytoskelett schon früh in der Embryogenese (E6,5) zu letalen Störungen kommt. Auch beim Menschen sind erbliche Erkrankungen bekannt, die auf Mutationen im Desmoplakin-Gen beruhen [4, 44, 53]. Eine autosomal-dominante Form führt aufgrund eines gestörten Aufbaus der Desmosomen in mechanisch beanspruchten Geweben zu reaktiver Hypertrophie mit Hyperkeratosen an Handflächen und Fußsohlen (Palmoplantarkeratosen). Eine ebenfalls beschriebene autosomal-rezessive Mutation führt zum Carvajal-Syndrom

[55], welches mit wolligem Haar, einer Keratodermatose und rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; ARVC) einhergeht [57].

Weiterhin kennt man Autoimmunerkrankungen, bei denen Autoantikörper gegen die Desmogleine DSG1 (*Pemphigus foliaceus*) und DSG3 (*Pemphigus vulgaris*) gebildet werden [93]. Die Bindung dieser Autoantikörper hat einen schwerwiegenden Integritätsverlust des Gewebes mit Loslösung der Keratinozyten (Akantholyse) zur Folge, welches zur Blasenbildung in der Epidermis (*P. foliaceus*) oder Mundschleimhaut (*P. vulgaris*) führt [71].

Ebenfalls sind Veränderungen im Plakoglobin-Gen nachgewiesen worden. Obwohl hier die Expression nicht nur auf das Myokard, die Haut und Haare beschränkt ist, zeigt der Gewebe-spezifische Phänotyp der Mutation die dominierende Rolle des Plakoglobins in der Aufrechterhaltung der Zellintegrität. Die autosomal-rezessive Naxos-Krankheit beim Menschen führt durch Mutationen der carboxy-terminalen Domäne von Plakoglobin zu einem verkürzten Protein [58]. Der Phänotyp ähnelt dem Carvajal-Syndrom mit ebenfalls wolligem Haar, Hyperkeratose der Handflächen und Fußsohlen und ARVC [49]. Auch im Modell der Plakoglobin $-/-$ Mäuse konnte die bedeutende Rolle des Proteins für die myokardialen Desmosomen von Ruiz et al. [76] nachgewiesen werden. Die homozygote Inaktivierung von Plakoglobin endete in den ersten Tagen (E10,5) der Embryonalentwicklung letal [6]. Dünne, brüchige Herzwände in den Atrien und Ventrikeln und unvollständig ausgebildete Trabekel führten zur Überflutung der Perikardhöhle mit fetalen Blutzellen. Die Epidermis und andere Epithelien blieben dabei jedoch unbeeinflusst. Überlebten Tiere (mit variierendem genetischem Hintergrund) bis zur Geburt, wiesen auch sie diverse Entwicklungsdefekte am Herzen auf. Da die Desmosomenzahl erheblich verringert war, stellten sich zusätzlich zur kardialen Dysfunktion auch epidermale Schäden wie subkorneale Akantholyse und ein Phänotyp ähnlich der humanen epidermolytischen Hyperkeratose mit Blasenbildung der Haut ein [6].

Die verschiedenen Erkrankungen, welche auf Mutationen der unterschiedlichen Strukturproteine der Desmosomen beruhen, zeigen die vielfältige und wichtige Aufgabe der Desmosomen im Zusammenhang mit Entwicklung, Stabilität und Erhalt von Geweben.

1.3 Plakophiline

Als zytoplasmatische Proteine kommen die relativ basischen Plakophiline in allen Desmosomen, jedoch spezifisch nach Gewebe exprimiert, vor [38, 81]. Bisher wurden in der Plakophilinfamilie drei Proteine beschrieben, PKP1 – 3. Sie alle gehören zu den *armadillo-repeat* Proteinen (*arm*-Proteine) [36]. Charakteristisch für diese *arm*-Proteine sind Sequenzwiederholungen von 42 bzw. 45 Aminosäuren (AS), sogenannten *arm-repeats*, welche sich in unterschiedlicher Anzahl in den einzelnen Proteinen wiederholen [38, 72]. Hinsichtlich der großen Homologien bezüglich der Aminosäure-Sequenz und zellulären Lokalisation lassen sich die verschiedenen Cadherin-assoziierten Armadillo-Proteine in Verwandtschaften zusammenfassen. Von den engverwandten Proteinen Plakoglobin und β -Catenin unterscheidet sich die p120^{CTN}-ähnliche Familie, die ihrerseits in zwei Subfamilien untergliedert ist, die p120^{CTN}-Familie im engeren Sinn und die Familie der Plakophiline [37, 81]. Die p120^{CTN}-verwandten Proteine (p120^{CTN}, p0071, δ -Catenin/NPRAP und ARVCF) assoziieren vor allem mit den klassischen Cadherinen in *adherens junctions*, während die Plakophiline (PKP1 – 3) desmosomal lokalisiert sind [38, 81]. Ein weiteres Charakteristikum, spezifisch für die Plakophilin-Subfamilie ist die sogenannte HR2-Domäne (*homology region 2*). Sie ist amino-terminal lokalisiert, besteht aus ca. 30 AS und scheint für die Bindung an Desmoplakin notwendig zu sein. In der p120^{CTN}-Familie findet sich in diesem Bereich ein anderes konserviertes Motiv, welches für die Dimerisierung der Moleküle verantwortlich zu sein scheint [81].

Gemeinsame Eigenschaft der Plakophiline ist die Fähigkeit, Desmoplakin an die Zytoplasma-Membran zu rekrutieren. Auch die Bindung anderer desmosomaler Proteine und Intermediärfilamente an die desmosomalen Plaques wird ihnen zugeschrieben. Somit sind sie essentiell für die Entwicklung und Integrität von Zellen und Geweben [32, 81, 91]. Generell muss mindestens ein Vertreter der Plakophiline zum Aufbau der Desmosomen in der Zelle vorhanden sein. Tatsächlich gibt es wenige Gewebe, die Desmosomen bilden, in denen lediglich eines der Plakophiline exprimiert wird. In den meisten Fällen finden sich zwei Plakophiline und gelegentlich werden von Zellen sogar alle drei Plakophiline gebildet. In den letzten Jahren wurden neben den strukturellen und mechanischen Aufgaben weite-

re Funktionen von Plakophilinen bekannt, unter anderem in der intrazellulären Signalgebung [17, 38].

1.3.1 Plakophilin 1

Der als erstes entdeckte Vertreter der Plakophilin-Familie wurde früher aufgrund des Laufverhaltens von Desmosomenpräparationen in der SDS-PAGE als Bande-6-Protein bezeichnet. Es hat ein abgeleitetes Molekulargewicht von 80.496 Da [39-40, 83] und ist hauptsächlich in den Desmosomen mehrschichtiger Epithelien zu finden [91]. Sein pI liegt bei pH 9,34 und sein Genlokus auf Chromosom 1q32. Aufgebaut ist PKP1 aus einem 273 AS umfassenden Amino-(N-)Terminus, dem 9 *arm-repeats* folgen (siehe 1.3) und das durch einen 34 AS Carboxy-(C-)Terminus komplettiert wird. Deletionsstudien konnten zeigen, dass der C-terminale Protein- teil (inkl. der *arm-repeat*-Domäne) für die Lokalisation an der Plasmamembran verantwortlich ist, während der N-Terminus für die Rekrutierung von Desmoplakin, aber auch für die Interaktion mit DSG1 und Keratinen verantwortlich ist. Funktionell sorgt PKP1 vor allem für die Quervernetzung von Desmoplakin-Molekülen [47, 89].

Bisher sind zwei Spleißvarianten, PKP1a und PKP1b bekannt [83]. Sie unterscheiden sich durch das zusätzliche Exon 7 in der korrespondierenden mRNA für PKP1b. Die kürzere Variante PKP1a findet sich sowohl im Nukleus der Zelle als auch differenzierungsabhängig in den Desmosomen, während PKP1b dagegen ausschließlich nukleär lokalisiert ist.

Weiske et al. konnten zeigen, dass PKP1 während der Apoptose ein frühes Caspase-Substrat darstellt und hierdurch Zell-Zell-Verbindungen zu apoptotischen Zellen aufgelöst werden [104].

Beschriebene Mutationen im *PKP1*-Gen sind die Ursache für das hereditäre *Ectodermal Dysplasia/Skin Fragility*-Syndrom (EDSF) [56]. Diese autosomal-rezessive Erkrankung geht einher mit reduzierten kleineren Desmosomen in den suprabasalen Epidermis-Schichten. Daraus resultiert eine verminderte Bindung von Desmoplakin und Keratinfilamenten, welche zum Verlust der Integrität der Haut bei mechanischer Belastung mit folgender Blasenbildung führt [91-92]. Darüber hinaus weisen EDSF-Patienten dystrophe Nägel an Fingern und Zehen auf,

der Haarwuchs ist stark reduziert und es kommt zur Bildung hyperkeratotischer Plaques an Handflächen und Fußsohlen (Keratodermie).

1.3.2 Plakophilin 2

PKP2 hat ein Molekulargewicht von 92.750 Da und kommt in allen Desmosomen-haltigen Zelltypen vor. Dazu gehören nicht nur die ein- und mehrschichtigen Epithelien, in denen es in den basalen Zellen zu finden ist, sondern auch die Myokardzellen, Purkinjefasern des Herzens und die dendritischen Retikulumzellen der Keimzentren in Lymphfollikeln. Auch in Zellen, die keine Desmosomen ausbilden, wird PKP2 exprimiert. Als Hauptvertreter der Plakophiline ist es ähnlich wie PKP1 neben der Lokalisation in den Desmosomen auch nukleär lokalisiert [60]. Bisher ist unklar, welche Aufgabe PKP2 im Nukleus übernimmt. Mertens et al. konnten jedoch eine direkte Interaktion mit dem RPC155, einem Protein des RNA-Polymerase III Holoenzymkomplexes nachweisen [59].

Der pI von PKP2 beträgt pH 9,33 und der Genlokus ist auf Chromosom 12p11 [80]. Es gibt ebenfalls 2 Spleißvarianten, einen kürzeren Isotyp (PKP2a) und die um ein Exon (44 AS) erweiterte Variante PKP2b.

In Desmosomen interagiert PKP2 über seinen N-Terminus mit Desmoglein 1 und 2, Desmocollin 1a und 2a, Desmoplakin und Plakoglobin [38]. Die Translokation von PKP2 in den Zellkern wird strikt reguliert. Durch Phosphorylierung einer spezifischen Aminosäure von PKP2 durch die CDC25C-assoziierte Kinase 1 (C-TAK1) wird ein Bindungsmotiv für das Protein 14-3-3 generiert. Diese Interaktion verhindert den Übertritt von PKP2 in Kern [63].

Plakophilin 2 *-/-* Mäuse zeigen schwere Entwicklungsstörungen des embryonalen Herzens. Aufgrund fehlerhafter Zell-Zell-Verbindungen der Kardiomyozyten werden Herzwände und Gefäße unvollständig gebildet. Dieses führt zum Tod in der Embryonalentwicklung (Tag E10,5 – E11) [32]. Im Menschen entwickelt sich bei Mutation eines Allels des *PKP2* eine bestimmte Form der erblichen arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) mit Ersatz der Kardiomyozyten durch Fibrozyten und Adipozyten. Damit gehen funktionale Störungen des Herzens einher, die über einen Herzstillstand zum Tode führen können [29, 96, 100]. Es ist bislang noch nicht vollkommen geklärt, ob es sich bei diesem Prozess um eine reaktive Neubildung von Narben- bzw. Fettgewebe in der Herz-

muskulatur, bedingt durch den Zelltod der Kardiomyozyten, handelt oder es durch veränderte Signalwege in den Kardiomyozyten zu einer Transdifferenzierung der Zellen kommt (Übersicht bei [41]).

1.3.3 Plakophilin 3

Der jüngste Vertreter der klassischen Plakophiline besitzt ein Molekulargewicht von 87,1 kDa. Sein pI liegt bei pH 9,38, somit ist PKP3 das basischste aller Plakophiline. Das Gen ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert und besteht aus 13 Exons [82]. Es wird in fast allen epithelialen Zellen exprimiert und wurde nur in Hepatozyten bisher nicht nachgewiesen. Auch Kardiomyozyten sind negativ für Plakophilin 3 [10-11, 82]. Spleißvarianten sind bis dato nicht beschrieben. Analog zu PKP1 und PKP2 kann es aufgrund der Primärsequenz in eine N-terminale Kopfdomäne (348 AS), gefolgt von 9 *armadillo-repeats* und einen kurzen C-terminalen Schwanz mit 22 Aminosäuren untergliedert werden.

In den Desmosomen interagiert PKP3 sowohl mit allen Desmogleinen, Desmocollin 3a und 3b als auch mit Desmoplakin und Plakoglobin. Zusätzlich konnte mit Hilfe von Hefe-*Two-Hybrid*-Analysen auch eine Bindung der Kopfdomäne an Keratin 18 nachgewiesen werden. Für die Anheftung an Desmoplakin existieren zwei Bindungsdomänen im Kopfbereich. Fehlt dieser Kopfbereich, lokalisiert das trunkierte PKP3 im Zellkern [10, 43], obwohl das komplette Protein bislang nicht im Zellkern nachweisbar war.

Weiterhin scheint Plakophilin 3 an der Bildung von Desmosomen beteiligt und wird hierzu von E-Cadherin und Plakoglobin zur Zellmembran rekrutiert [30].

Unabhängig davon konnten inzwischen auch Interaktionen außerhalb der Desmosomen für PKP3 beschrieben werden. So bindet PKP3 ribosomales Protein S6 (40S-Untereinheit), *fragile-X-related protein* (FXR1), das RNA-bindende Protein PABC1, *ras-GAP-SH3-binding protein* (G3BP) und eIF-4E [38, 42]. Diese Bindungspartner weisen auf eine Rolle von PKP3 bei Translationsprozessen oder der post-transkriptionellen Genregulation hin.

Eine Kolokalisation mit PABC1 und G3BP zeigte sich in sogenannten Stressgranula [42]. Diese RNA-enthaltenden zytoplasmatischen Vesikel werden gebildet, wenn Zellen gewissem Stress, wie zum Beispiel Hitze, oxidativem Stress

oder einer Virusinfektion ausgesetzt sind. Vornehmlich bestehen sie aus translational stillgelegten mRNA-Konglomeraten [45].

Ob PKP3 in der Lage ist, selbst RNA zu binden, ist bisher noch ungeklärt. Es weist in seiner Sequenz keine klassischen Bindemotive für RNA auf, jedoch könnte aufgrund seiner Basizität eine elektrostatische Interaktion auftreten [42].

Weitere Hinweise auf diese zusätzliche Funktion konnten in jüngster Zeit durch die Identifizierung weiterer Interaktionspartner von PKP3 durch unsere Arbeitsgruppe erbracht werden, die ebenfalls Bestandteil der Proteinbiosynthese sind. So wurden Interaktionen mit den Initiationsfaktoren eIF-4A1 und eIF-6, dem Elongationsfaktor eEF-1G, dem ribosomalen Protein RPS2 und dem RACK1-Protein, einem Bindungspartner der aktiven PKC, identifiziert [24, 34-35]. Die genaue Funktion von Plakophilin 3 außerhalb von Desmosomen ist bislang aber noch nicht geklärt.

Mäuse mit einem Plakophilin 3-*knock out* zeigen die Bedeutung von PKP3 sowohl für die Morphogenese von Haarschäften und -follikeln als auch in der Kontrolle inflammatorischer Antworten der Haut [87].

Auch die Stabilität von Keratinozyten untereinander und damit die Integrität der Haut wird von PKP3 stark beeinflusst, wie Cirillo und Prime anhand eines experimentellen *Pemphigus vulgaris*-Modells zeigen konnten [21]. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Autoantikörper, welche aus paraneoplastischen *Pemphigus*- und *Pemphigus vulgaris*-Patienten gewonnen wurden und eine Autoreaktivität gegen Plakophilin 3 aufwiesen [54].

1.3.4 Plakophilin 3 und Tumoren

Es ist bekannt, dass zelluläre Adhäsionsmoleküle, vor allem E- und β -Catenin, eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren spielen [14]. Auch für desmosomale Proteine gibt es Hinweise, die jedoch in ihrer genauen Funktion und dem Ausmaß der Beteiligung noch weiter untersucht werden müssen [19]. In den letzten Jahren zeigte sich vermehrt, dass PKP3, wie auch die anderen Plakophiline, in die Tumorgenese involviert zu sein scheint. So konnte von Schwarz et al. Plakophilin 3 in histologischen Schnitten von oropharyngealen Plattenepithel-Tumoren immunhistochemisch nachgewiesen werden [85]. Die Expression von PKP3 war hier vergleichsweise stark und in al-

len untersuchten Geweben zu finden. Dabei scheint die PKP3-Expression invers mit dem Grad der Malignität dieser Art von Tumoren zu korrelieren. Eine Ausnahme bildeten hepatozelluläre Karzinome: hier konnte keine PKP3-Expression nachgewiesen werden.

In Adenokarzinomen verschiedener Organe wie Pankreas, Colon oder Prostata konnte PKP3 ebenfalls nachgewiesen werden. In diesen Entitäten fanden sich in manchen Fällen Veränderungen der Polarität der desmosomalen Anfärbbarkeit [69, 85].

Furukawa et al. fanden sowohl eine Überexpression von PKP3 in nicht-kleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) [26] als auch in daraus abgeleiteten Zelllinien. Zusätzlich führte die Inhibierung der Plakophilin 3-Expression in den kultivierten NSCLC-Zellen mit Hilfe von siRNA-Experimenten zu einer verringerten Migrationsrate und Überlebensfähigkeit der Zellen. Übereinstimmend wurde durch Überexpression von PKP3 in COS-Zellen eine verstärkte Tumorpherationsrate induziert, welche mit einer erhöhten Aktivität in *in vitro*-Invasionsanalysen einherging. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren auf ein onkogenes Potential von PKP3, wenn es unter aktivierten Bedingungen im Zytoplasma lokalisiert ist.

In neuerer Zeit kamen zusätzlich Hinweise dazu, dass Plakophilin 3 am Prozess des Übergangs von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe (EMT; *epithelial mesenchymal transition*) beteiligt sein könnte. Diese Transition spielt eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen [1]. Untersuchungen der PKP3-Expression in Zellen aus invasiven Tumoren zeigten, dass PKP3 anscheinend durch den Transkriptionsfaktor ZEB1 in seiner Expression gehemmt wird. ZEB1 ist auch als potenter Repressor von E-Cadherin in ebenfalls diesen Zellen bekannt und trägt hier zur Metastasierung von Mammakarzinomen bei [79]. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass in kolorektalen Karzinomen ZEB1 in differenzierten Bereichen immunhistochemisch nicht angefärbt wird und PKP3 eine normale Expressionsrate zeigt. Hingegen findet sich am Übergang von tumorösen zu normalen Gewebe eine Akkumulierung von ZEB1 mit einhergehendem Verlust der Plakophilin 3-Färbung im Bereich der Membran. Auch Kundu et al. haben in epithelialen Zelllinien (HCT116, HaCaT, fetale bukkale Mukosazellen) eine Korrelation zwischen dem Verlust von PKP3 mit an-

schließlichem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und dem Anstieg der Migrationsrate der Zellen beobachtet, einhergehend mit einer vermehrten *in vivo*-Tumorprogression und Metastasierungsrate in Mäusen [51].

Im Gegensatz dazu wurde für Adenokarzinome der Prostata gezeigt, dass niedrig-maligne Tumore mit einer niedrigeren Expressionsrate von Plakophilin 3 einhergehen. Außerdem zeigte sich, dass hier eine Überexpression zu gesteigerter Proliferationsrate von DU 145-Zellen (humane Prostatakarzinomzelllinie) führte und sowohl erhöhte als auch erniedrigte Konzentrationen von PKP3 mit Verlust von desmosomalen Kontakten einherging [15].

Diese unterschiedlichen und zum Teil kontroversen Hinweise auf eine Rolle des PKP3 in der Tumorgenese zeigen eindrücklich, wie unerforscht die Funktion von PKP3 in diesem Bereich ist.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, verschiedene Spleißvarianten von Plakophilin 3 zu identifizieren und, falls vorhanden, zu charakterisieren. Bisher wurde, im Gegensatz zu PKP1, PKP2, p0071 und verschiedenen anderen Cateninen, noch keine Spleißvariante für PKP3 beschrieben [81, 99]. Allerdings gab es durch immunbiochemische Untersuchungen Hinweise darauf, dass Polypeptide unterschiedlicher Größe durch PKP3-spezifische Antikörper detektiert werden können (A. Schmidt, persönliche Mitteilung). Vor dem Hintergrund, dass Plakophilin 3 eine Rolle in der Tumorgenese verschiedener Tumoren spielt [1, 26], ist die Identifikation weiterer Spleißvarianten von großem medizinischem Interesse.

Anhand von genauen Analysen hinterlegter DNA- und mRNA-Sequenzen, sowie der experimentellen Analyse isolierter mRNA-Moleküle aus unterschiedlichen Geweben und Zellen durch RT-PCR sollen Spleißformen ermittelt und charakterisiert werden. Nach der Identifikation alternativer Spleißformen von PKP3 sollen spezifische Antikörper hergestellt werden, die eine Unterscheidung der verschiedenen Varianten ermöglichen. Mit Hilfe dieser Isotyp-spezifischen Antikörper soll untersucht werden, inwiefern sich die Varianten in der zellulären Lokalisation unterscheiden. Ferner sollen die Antikörper zur Analyse von Expressionsprofilen der PKP3 Spleißformen in verschiedenen Geweben und Kulturzellen benutzt wer-

den. Schließlich soll die Frage geklärt werden, ob sich verschiedene Varianten von PKP3 in ihrem Expressionsverhalten in normalem Gewebe und Tumoren unterscheiden. Damit könnten die hergestellten Antikörper für diagnostische Zwecke einsetzbar sein.

2 Material

2.1 Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator CB210, Binder, Tuttlingen
Brutschrank (Mikrobiologie)	Function Line B6, Heraeus, Hanau
Elektroporator	Multiporator, Eppendorf, Hamburg
Entwickler (Röntgenfilme)	Curix 60, AGFA, München
Geldokumentation	TP1, Herolab, Wiesloch
Gellaufkammer	Mini-Sub-Cell-System, Bio-Rad, München
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Immunfärbeautomat	Autostainer Plus, Dako, Hamburg
Kamera	ORCAII ER, Hamatsu, Herrsching
Kryostat	HM560, Miron, Walldorf
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr, Biberach an der Riss; Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührer	RH basic, IKA Works, Wilmington, USA
Mikroskop	1. Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop, Carl Zeiss, Jena 2. DMRB, Durchlicht-Mikroskop, Leica, Bensheim
Mikrowellenofen	1. Panasonic, Hamburg 2. micromed T/T Mega, Hacker-Milestone, Winnsboro, USA
Nassblot-Kammer	Mighty Small Transphor, Amersham Bioscience, Piscataway NJ, USA
Netzteil	PowerPAC BASIC, Bio-Rad, München
pH-Meter	Schott, Mainz
Photometer	GeneQuant pro, Biochrom, Cambridge, Großbritannien
PCR <i>Cycler</i>	PTC-200 DNA Engine, Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterilbank	Laminair, Holten, Allerød, Dänemark

Tischzentrifuge	Biofuge pico, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	GJ, Kern, Balingen-Frommen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Blot-Papier	Trans-Blot® SD DNA Blotting Kit, Bio-Rad, München
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nitrozellulosemembran	Optitran BA-S85, Whatman, Kent, Großbritannien
Probenröhrchen	(15ml, 50ml), Greiner Bio-One, Frickenhausen
Parafilm M	Pechineg Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Reaktionsgefäße	(2ml, 1,5ml, 0,2ml), Sarstaedt, Nümbrecht
Objektträger	Superfrost R plus, Menzel-Gläser, Braunschweig
QIAshredder™ Säulen	Qiagen, Hilden
Zellkulturschalen	Easy Grip Tissue Culture Dish, 100 x 20 mm (200 mm ²); 60 x 15 mm (90mm ²), BD Falcon, NJ, USA

2.3 Kits

QIAGEN® RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Micro Peptide Coupling Kit	Pierce, Rockford, IL, USA

mTRAP™ Midi mRNA Isolation Kit	Active Motif, Carlsbad, USA
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Madison, USA
RETROscript® Kit	Ambion, Inc. Austin, USA

2.4 Chemikalien

Aceton	Acros organics, NJ, USA
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	USB Corporation, Cleveland OH USA
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
<i>Aqua destillata</i> (A. dest.)	Milli-Q Biocel, Millipore, Schwalbach
Betain	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biostab PCR Optimizer	Fluka, Buchs, CH
Blasticidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
DNA Größenstandard	1. 1kb, Invitrogen, Karlsruhe 2. 100bp, New England BioLabs, Frankfurt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka, Buchs, Schweiz
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
DAB + Chromogen (x50)	Dako, Hamburg
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMP	Fluka, Buchs, Schweiz
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoromount G	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Merck, Darmstadt

Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
HRP substrate buffer	Dako, Hamburg
IPTG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopentan	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
jetPEI™ Transfection Reagent	Biomol, Hamburg
Kaleidoskope	Bio-Rad, München
Prestained Standards	
Kaleidoskope	Bio-Rad, München
Polypeptide Standards	
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Baker Analyzed Reagent, Va Deventer, Niederlande
LB Agar	USB Corporation, Cleveland OH, USA
LB Medium	USB Corporation, Cleveland OH, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ 6x H ₂ O	Baker Analyzed Reagent, Va Deventer, Niederlande
NaCl	Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl	Fluka, Buchs, Schweiz
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Roth, Karlsruhe
10x Nukleotide (2mM)	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR Puffer, 10x konz. mit MgCl ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
Ponceau S-Lösung (5x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Assay (5x)	Bio-Rad, München
REAL™ Antibody Diluent	Dako, Hamburg

REAL TM Streptavidin Peroxidase	Dako, Hamburg
REAL TM Peroxidase-Blocking Solution	Dako, Hamburg
SDS	Bio-Rad, München
SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science, Vervies, Belgien
SuperSignal® West Pico Chemiluminiszenz Substrat	Pierce, Rockford, IL, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek® O.C.T TM Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rhijn, Niederlande
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Waschpuffer Immunhistochemie	10x Wash Buffer, Dako, Hamburg
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium	1. DMEM, Gibco, Karlsruhe 2. EMEM, Lonza, Karlsruhe

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Untersuchungsmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Gewebematerial entstammte aus chirurgischen Resektaten oder aus Obduktionen. Nach der Entnahme wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C asserviert oder in 10 % Formalinlösung (3,76 % Formaldehyd) fixiert und dann in Paraffin eingebettet und nach der histologischen Routineuntersuchung im Gewebearchiv des Instituts für Pathologie der Philipps-Universität Marburg archiviert. Es wurden keine patientenbezogenen Daten verwendet.

2.5.2 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in DMEM kultiviert. CaCo-2 wurde in EMEM mit 1 mmol L-Glutamin kultiviert.

A431 (ATCC-Nr.: CRL-1555)	humanes epidermoides Karzinom, epithelial
A549 (ATCC-Nr.: CRL-185)	humanes bronchioalveoläres Karzinom der Lunge, epithelial
CaCo-2 (ATCC-Nr.: HTB-37)	humanes Adenokarzinom des Colons, epithelial
HaCaT (P. Boukamp, Heidelberg)	humane Keratinozyten, <i>in vitro</i> spontan transformiert
HT-29 (ATCC-Nr.: HTB-38)	humanes Adenokarzinom des Colons, epithelial
MCF-7 (ATCC-Nr.: HT-22)	humanes Adenokarzinom der Mamma, epithelial
PLC (ATCC-Nr.: CRL-8024)	humanes Leberzellkarzinom, epithelial

2.5.3 Plasmidvektoren und Bakterienstämme

pBskR3	Derivat des pBluescriptII SK ⁻ , Stratagene, Heidelberg
pcDNA6/HIS TM	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM [®] T-Easy	Promega, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> JM109	chemisch kompetent; Promega, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	elektrisch kompetent; Stratagene, Heidelberg

2.5.4 Versuchstiere für Generierung polyklonaler Antikörper

Kaninchen	New Zealand White, Charles-River Wega, Sulzfeld
-----------	---

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Tab. 2-1 Verwendete Primärantikörper

Ak	Klasse/ Spezies	Immunoblot	Immun- fluoreszenz	Immun- histochemie	Hersteller
Anti PKP3 PKP3- 310.9.1	Monoklonal Maus IgG ₁	1:500	1:50, 1:100, 1:200, 1:500	-	DKFZ, Heidelberg
Anti PKP3a	Polyklonal Kaninchen	1:500	1:250, 1:500	1:150	Diese Arbeit
Anti PKP3b	Polyklonal Kaninchen	1:1000	1:500	1:1000	Diese Arbeit

2.6.2 Sekundärantikörper

Tab. 2-2 Verwendete Sekundärantikörper

Ab	Spezies	Immunoblot	Immunfluoreszenz	Hersteller
Anti- Kaninchen, HRP gekoppelt	Schwein	1:1000	-	Dako, Hamburg
Anti-Maus, HRP gekoppelt	Kaninchen	1:500	-	Dako, Hamburg
Anti-Maus, Cy3	Ziege	-	1:2000 (bei Doppelloka- lisation 1:3000)	Dianova, Hamburg
Anti-Maus, Cy2 (Fab 2)	Ziege	-	1:400	Dianova, Hamburg
Anti- Kaninchen, Cy3	Esel	-	1:1000	Dianova Hamburg

Den Immunfluoreszenzen wurde DAPI zugesetzt, um den Kern anzufärben. Hierzu wurde der DAPI-Farbstoff 1:20.000 mit ddH₂O verdünnt und für die letzten 5min mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Die mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten (HRP= *Horse Radish Peroxidase*) Antikörper wurden ausschließlich zum immunbiochemischen Nachweis (siehe 3.4.3.2) verwendet.

Für die Immunhistochemie wurde das REALTM Link biotinylated secondary antibodies-Gemisch (Dako) für die Sekundäntikörper genutzt.

2.7 Primer

Lyophilisierte *Primer* wurden von Biomers.net (Ulm) synthetisiert und bezogen. Sie wurden in *Aqua dest.* gelöst und auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Anschließend wurden die *Primer* aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzen der verwendeten *Primer* sind der Tabelle Tab. 2-3 zu entnehmen.

2.8 Enzyme

<i>Bam</i> HI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Bsi</i> WI	New England BioLabs, Frankfurt
<i>Eco</i> RI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Kpn</i> I	New England BioLabs, Frankfurt
Phusion TM High-Fidelity PCR Master Mix	New England BioLabs, Frankfurt
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Thermo-X TM Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

1x PBS (auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert)

2,7mM	KCl
1,5mM	KH ₂ PO ₄
140mM	NaCl
8,1mM	Na ₂ HPO ₄

1x PBS/EDTA (auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert)

Zusätzlich wurden 7mM EDTA hinzugegeben.

1x PBS/2 mM MgCl₂ (auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert)

Zusätzlich wurden 2mM MgCl₂ hinzugegeben.

1x PBS mit 4 % Formaldehyd

Zusätzlich wurden 4 % Paraformaldehyd (PFA) vor Gebrauch hinzugegeben.

1x PBS mit 0,1 % Triton X-100

Zusätzlich wurden 0,1 % Triton X-100 (v/v) hinzugegeben.

1x TBS (auf pH 7,5)

10mM Tris-HCl

150mM NaCl

1x TBST

10mM Tris-HCl

150mM NaCl

0,1 % (w/v) Tween 20

Tab. 2-3 Verwendete *Primer*; T_m = Schmelztemperatur

(A) 5'-RACE		
<i>Primer</i>	Sequenz	T _m
UPMlong	5'- CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC AACGCAGAGT-3'	73 °C
Sense Adapter SA	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGNNNNN-3'	n.a., da willkürliche Nukleotide
Antisense Adapter ASA	5'-p-ACTCTGCGTTGATAACCACTGCTT-3' (5'-Ende phosphoryliert)	55 °C
PKP3-B outer	5'-GCCCCGAGGTCTTGTCCCCACTC-3'	63 °C
PKP3-B inner	5'-CCCCTGGATGTGCCTCTGGCAGTC-3'	66 °C
PKP3_Splice_Rv_3103	5'-CCGGCTCGTGGTCCGGATCCC-3'	68 °C
(B) PCR des bekannten Teils		
<i>Primer</i>	Sequenz	T _m
PKP3_Splice_Fw_3103	5'-GCGCCGGGCCAGGGATGGA-3'	69 °C
PK3_GS_600_Rv	5'-GCCGCAGCGAGCGCAGGGAGAGTGT-3'	73 °C
PK3_GS_1200_Rv	5'-CCTGTGGCATGGCGCTGCACTTCCTG-3'	72 °C
PK3_GS_1800_Rv	5'-ACACCTCCGCGAAGGTGAGCGCATCG-3'	73 °C
PK3_GS_2400_Rv	5'-CTGAGTCTGTCCCTTGGACGCTGGGCCAC-3'	73 °C
(C) Start-Codon-Suche		
<i>Primer</i>	Sequenz	T _m
Upstream1_Fw	5'-ATGCCGCCCAGCCTGGCC-3'	65 °C
Upstream2_Fw	5'-ATGCCAGGCACATACCTCCAGGC-3'	63 °C
Upstream3_Fw	5'-ATGAGCTGGGCGTTCCACCC-3'	64 °C
PKP3-B Outer	5'-GCCCCGAGGTCTTGTCCCCACTC-3'	63 °C

3 Methoden

3.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

3.1.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zellen, vor allem etablierte Linien, können durch Gefrierkonservierung in flüssigem Stickstoff über einen langen Zeitraum unter weitestgehender Beibehaltung ihrer Vitalität gelagert werden. Da durch die Entstehung intrazellulärer Eiskristalle die Zellen geschädigt werden können, wurde 500 µl „Einfriermedium“, zusammengesetzt aus 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 80 % Zellkulturmedium und 10 % FKS, mit 500 µl Zellsuspension (ca. 10×10^6 Zellen/ml) versetzt und in Kryo-Röhrchen überführt. Somit wurden Zellen in einer Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingefroren. Da DMSO ab einer Konzentration von 4 % oder höheren Temperaturen toxisch wirkt, wurden die Zellen innerhalb kürzester Zeit bei -80 °C in einer Styroporbox ü.N. gelagert, um zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt werden.

Beim Auftauvorgang war es notwendig, die Zellen vor einem osmotischen Schock zu bewahren. Um die Vitalität nicht zu gefährden, wurden die Zellen sehr schnell aufgetaut und langsam mit frischem Medium versetzt. Dazu wurde der Inhalt der Kryo-Röhrchen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml frischem DMEM + 10 % FCS gemischt. Nach dem Zentrifugieren der Falcon-Röhrchen (10 min. bei 1.000 rpm; Varifuge 3.0R, Heraeus) wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 60 mm Zellkulturschale überführt.

3.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gehandhabt. Im Brutschrank wurden sie bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit bei 5 % CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden je nach Konfluenzgrad alle 4 - 5 Tage passagiert. Dazu wurde Medium abgesaugt und mit EDTA-haltigem PBS (7 mM) zweimal gespült. Anschließend wurden die Zellen entweder mit dem Zellschaber von der Unterlage gelöst oder mit PBS/0,25 % Trypsin versetzt, bei 37 °C inkubiert und nach Zuga-

be von 3 ml Vollmedium von der Schale gespült. Nach der Überführung in ein Kultur-Röhrchen wurden die Zellen 10 min abzentrifugiert bei 1.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus), wiederholt mit 10 ml Medium gewaschen und nach Resuspension in 10 ml Medium entsprechend der gewünschten Aufteilungsrate in neue 100 mm Zellkulturschalen passagiert und weiter kultiviert.

Um für die Immunfluoreszenz mit Zellrasen bewachsene Glasplättchen zu erhalten, wurden nach einer Passage Glasplättchen zur Zellkulturschale gegeben. War die gewünschte Konfluenz erreicht, wurden die Plättchen aus der Schale genommen und fixiert.

A431-Zellen benötigten DMEM *High Glucose*-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS).

3.1.3 Fixierung von Zellen/ Geweben

Um die Zellstrukturen in einem weitestgehend physiologischen Zustand zu erhalten, mussten sie fixiert werden. Deren Grundprinzip basiert auf der denaturierenden (Methanol/Aceton) oder quervernetzenden (Formaldehyd) Wirkung der Fixationsmittel, bei der die Proteine unlöslich werden.

3.1.3.1 Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenz

Methanol-Aceton-Fixierung

Die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen wurden bei dieser Fixierungsmethode in einem speziellen Ständer in PBS mit 2 mM MgCl_2 (pH=7,4) für 5 min gewaschen, um eine bessere Kernerhaltung zu erzielen. Danach wurde der Ständer inklusive der Plättchen für 5 min in -20 °C kaltes Methanol gestellt. Anschließend ließ man das Methanol ablaufen und der Ständer wurde für 1 min in -20 °C kaltes Aceton transferiert. Zum Trocknen wurden die Plättchen dann aus dem Aceton entnommen und mit der Zellseite nach oben auf Filterpapier gelegt. Die fixierten Zellplättchen können bei -20 °C gelagert und jederzeit zur Fluoreszenzfärbung aufgetaut werden.

3.1.3.2 Fixierung von Geweben für die Immunfluoreszenz

Frische Gewebeproben wurden in Isopentan (in flüssigem Stickstoff auf etwa -70 °C vorgekühlt) asserviert und bei -80 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert. Zur Herstellung von Dünnschnitten (ca. 5 μm) wurde das Gewebe aus der Tiefkühltruhe

entnommen und in OCT (Tissue Tek) auf Trockeneis eingebettet. Das eingebettete Gewebe wurde dann auf ein dünnes Korkplättchen gegeben und dieses in ein Kryostaten (HM560, Miron) eingespannt. Die Herstellung von Kryoschnitten wurde bei -25 °C durchgeführt, die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit kaltem Methanol (-20 °C) fixiert. Nach Lufttrocknen wurden die Kryoschnitte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2 Nukleinsäuretechniken

3.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Gesamt-RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Zwei konfluent gewachsene 60 mm Zellschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit je 500 µl RLT-Puffer (1:1000 mit β-Mercaptoethanol versetzt) je Schale bedeckt, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde das Zelllysate mit dem Gummischaber Rubber Policeman geerntet und auf eine QIAshredder™ Säule gegeben. Nach dem Zentrifugieren für 2 min bei 13.000 rpm wurde ein Volumen 70 % Ethanol zugegeben und die Lösung durch Pipettieren homogenisiert. Dann wurde 700 µl des Lysates auf eine RNeasy Säule gegeben und entsprechend dem Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen nach Herstellerangaben verfahren. Zum Eluieren wurden 40 µl TE-Puffer eingesetzt und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der RNA-Gehalt des Eluates photometrisch vermessen. Die eluierte RNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.2.2 mRNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung von mRNA aus HaCaT-Zellen wurde das mTRAP Midi Kit (Active Motif) verwendet.

Es wurden 1×10^7 HaCaT-Zellen in der Zellkulturschale angezogen und dreimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Danach wurde 1 ml Lyse Puffer (Herstellung nach Herstellerangaben) direkt auf die Zellen gegeben. Die lysierten Zellen wurden mit dem Rubber Policeman von der Oberfläche geschabt und auf eine QIAshredder™ Säule gegeben. Nach dem Zentrifugieren für 2 min bei 13.000 rpm war das

Zelllysate homogenisiert. Die folgende mRNA-Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben des mTRAP Midi Kits durchgeführt und anschließend 75 µl des Überstands abgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer spektralphotometrischen Bestimmung.

Dazu wurde die Absorption von 5 µl der Probe in 95 µl ddH₂O gegen den Leerwert (100 µl ddH₂O) bei 260 nm ($A_{260}=0,113$) und 280 nm ($A_{280}=0,062$) gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und bei 280 nm (A_{280}) gab Aufschluss über die Kontamination der RNA mit DNA oder Protein und sollte idealerweise bei $> 1,8$ liegen (hier: $A_{260} / A_{280} = 1,823$). Aus der Absorption bei 260 nm konnte man mit nachstehender Formel die Konzentration der RNA in µg/ml berechnen:

$$[\mu\text{g/ml RNA}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Umgerechnet ergab sich daraus für die Isolierung eine mRNA-Konzentration von 0,09 µg/µl.

3.2.3 Reverse Transkription von Gesamt-RNA / mRNA

Um RNA aus Zellen zu analysieren, wurde sich der reversen Transkription bedient. Hierbei wurde einzelsträngige RNA mittels eines speziellen Enzyms (Reverse Transkriptase) in DNA umgeschrieben. Die entstandene DNA wird als cDNA (*complementary* DNA) bezeichnet und war die Matrize für die folgende PCR. Zur Herstellung von cDNAs wurde das RETROscript® Kit (Ambion) mit *Random Decamer Primer* nach Herstellerangaben verwendet.

Die unter 3.2.2 isolierte mRNA wurde mit Hilfe der ThermoScript™ Reverse Transkriptase (3.2.5.1) umgeschrieben.

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren, um selektiv Nukleinsäuren definierter Länge und Sequenz in einem Gemisch aus verschiedenen Nukleinsäure-Molekülen anzureichern. Dazu wurden je zwei spezifische Oligodesoxyribonukleotidstränge (*Primer*), welche nach Hitzedenaturierung der cDNA mit der Zielsequenz hybridisierten (*Annealing*), verwendet. Eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Phusion™ DNA

Polymerase) synthetisierte dann den Gegenstrang mit Hilfe der im Reaktionsgemisch vorhandenen Desoxyribonukleotidtriphosphat-Moleküle (dNTP). Die gesuchte Sequenz wurde durch Wiederholung der Prozedur Zyklus für Zyklus exponentiell amplifiziert. In dieser Arbeit wurde dazu der PhusionTM Mastermix mit dem GC-Puffer eingesetzt, als *Primer* wurden die unter Tab. 2-3 (B) und (C) angegebenen verwendet.

PCR-Ansatz für 50 µl Endvolumen (in Klammern jeweils die Endkonzentrationen):

Phusion TM Mastermix (2x)	25 µl
Template (cDNA)	0,5 µl
Fw- <i>Primer</i> (0,5 µM)	2 µl
Rv- <i>Primer</i> (0,5 µM)	2 µl
DMSO (13 %)	6,5 µl
A. dest.	14 µl

Zyklusbedingungen:

	30 s	98 °C	<i>Hot start</i>
Für 35 Zyklen:	5 s	98 °C	Denaturierung DNA
	10 s	x °C (<i>Primer</i> -abhängig)	<i>Annealing</i>
	x min	72 °C (Amplifikat-abhängig)	<i>Extension</i>

Anschließend noch 5 min bei 72 °C und dann den *Cycler* auf 4 °C abkühlen lassen, um die Reaktion zu beenden. Die Spezifität der PCR wurde mittels Weglassen der Matrize in der PCR kontrolliert.

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht kontrolliert, ob das PCR-Produkt der gewünschten Größe synthetisiert wurde, wobei gleichzeitig die Möglichkeit besteht, die vorhandenen Bande zu isolieren. Zur weiteren Verwendung der PCR-Produkte wurden diese nach 3.2.6.1 und über ein QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Abweichend vom Protokoll wurde die Säule vor der Elution der DNA erst luftgetrocknet, bis das Ethanol verflogen war und dann erst mit 20 µl EB-Puffer eluiert. Dazu wurde der Puffer auf die Säule gegeben, diese 1 min ru-

hen gelassen und dann für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat noch einmal auf die Säule gegeben und ein letztes Mal zentrifugiert.

3.2.5 5'-*Rapid amplification of cDNA ends* nach Shi und Jarvis

Um die mögliche Spleißvariante in Richtung 5'-Ende zu vervollständigen und die Sequenz dieser zu erhalten, musste eine cDNA generiert werden, welche Sequenzen stromaufwärts der bekannten Basenpaare besaß, und diese dann amplifiziert werden. Diese Methode wird *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE) genannt und in 5'-Richtung durchgeführt. Die hier verwendete Methode nach Shi und Jarvis [86] ist dazu geeignet, extrem GC-reiche Sequenzen aufzuschlüsseln und zu amplifizieren. Dazu waren mehrere Schritte notwendig. Die Sequenzen der hier genutzten *Primer* und Oligonukleotide sind in Tab. 2-3 (A) aufgeführt.

3.2.5.1 Synthese der cDNA

Um die GC-reiche Sequenz zu denaturieren, wurden 1 µg der isolierten mRNA in Gegenwart von 0,35 µM (Endkonzentration) des Gen-spezifischen *Primer* (PKP3-B outer), 0,7 mM (Endkonzentration) jedes dNTPs und 0,67 M Biostab PCR Optimizer für 2 min bei 70 °C in einem Endvolumen von 14,5 µl inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz sofort für 2 min auf Eis gestellt und anschließend 4 µl 5x Thermo-XTM Reaktionspuffer und 1,5 µl Thermo-XTM hinzugeben. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Ansatz wie folgt im PCR *Cycler* inkubiert:

5 min	55 °C
45 min	70 °C
15 min	75 °C

20 µl 0,6 N NaOH wurden anschließend zugegeben und für 20 min bei 65 °C inkubiert, um die verbleibende mRNA zu hydrolysieren und die Einzel-Strang-cDNA zu denaturieren. Danach wurde die cDNA präzipitiert, indem die Reaktionslösung auf 0,5 M NaCl eingestellt und das 2,5-fache Volumen an 100 % Ethanol hinzugegeben wurde. Nachdem dann dieser Ansatz für 2 h bei -80 °C inkubiert worden war, wurde die cDNA bei 13.000 x g (Biofuge fresco, Heraeus) pelletiert, in 70 % Ethanol gewaschen und in 10 µl der im nächsten Schritt beschriebenen, auf 10 µM konzentrierten Adapter-Lösung gelöst.

3.2.5.2 Ligation des Adapters:

Der Adapter wurde wie folgt präpariert: Die Oligonukleotide *Sense*-Adapter und *Antisense*-Adapter wurden in einer Endkonzentration von je 10 μM in einem *Annealing*-Puffer, bestehend aus 10 mM TRIS-HCl (pH=8) und 50 mM NaCl, gelöst, in ein kochendes Wasserbad gegeben, um die möglicherweise entstandenen Nukleotid-Dimere zu lösen und den überlappenden Adapter zu generieren. Anschließend wurde diese Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Der Adapter wurde mit der im vorherigen Schritt generierten cDNA wie oben beschrieben versetzt. Um nun die Ligation durchzuführen, wurden 3 μl des Adapter-cDNA-Ansatzes mit 1 μl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 1 μl T4 DNA Ligase gemischt, auf 10 μl mit A. dest. aufgefüllt und ü.N. bei RT inkubiert.

Wenn die so mit dem Adapter ligierte cDNA genutzt werden sollte, musste sie vor Gebrauch 5-fach mit ddH₂O verdünnt werden.

3.2.5.3 PCR Amplifikation

Die Amplifikation wurde zweizeitig als sogenannte *semi-nested* PCR durchgeführt.

Für den ersten Amplifikationsschritt wurde ein PCR Mix, bestehend 25 μl Phusion High-Fidelity PCR Master Mix mit GC Puffer, 1 μl des verdünnten Adapter-cDNA-Mixes, ein Gen-spezifischer *Primer* (PKP3-B inner) mit einer Endkonzentration von 0,2 μM , 5 % (v/v) DMSO, 1 M Betain und ein zum 3'-Ende des Ligationsadapters komplementärer *Primer* (UMPlong) mit einer Endkonzentration von 0,2 μM angesetzt und auf 50 μl aufgefüllt. Die Zyklusbedingungen der folgenden *Touchdown*-PCR waren:

Initialer Denaturierungsschritt: 3 min 98 °C

5 Zyklen:	30 s	98 °C	Denaturierung
	15 s	70 °C	} <i>Annealing</i>
	15 s	63 °C	
	15 s	56 °C	
	15 s	72 °C	} <i>Extension</i>
	20 s	75 °C	
	25 s	78 °C	

30 Zyklen:	30 s	98 °C	Denaturierung
	15 s	58 °C	<i>Annealing</i>
	15 s	72 °C	} <i>Extension</i>
	20 s	75 °C	
	25 s	78 °C	

Anschließend noch 5 min bei 72 °C inkubieren und dann den *Cycler* auf 4 °C abkühlen lassen, um die Reaktion zu beenden.

Zweiter Amplifikationsschritt (interne PCR): es wurden 1 µl des im vorherigen Schritt generierten Amplifikats mit dem zweiten *nested* Gen-spezifischen *Primer* (PKP3_Splice_Rv_3103) in einer Endkonzentration von 0,2 µM und dem bereits eingesetzten UMPlong-*Primer* verwendet. Die anderen Komponenten entsprachen dem ersten Amplifikationsschritt. Die Zyklusbedingungen waren:

Initialer Denaturierungsschritt:	3 min	98 °C	
30 Zyklen:	30 s	98 °C	Denaturierung
	15 s	66 °C	<i>Annealing</i>
	15 s	72 °C	} <i>Extension</i>
	20 s	75 °C	
	25 s	78 °C	

Anschließend noch 5 min bei 72 °C inkubieren und dann den *Cycler* auf 4 °C abkühlen lassen, um die Reaktion zu beenden.

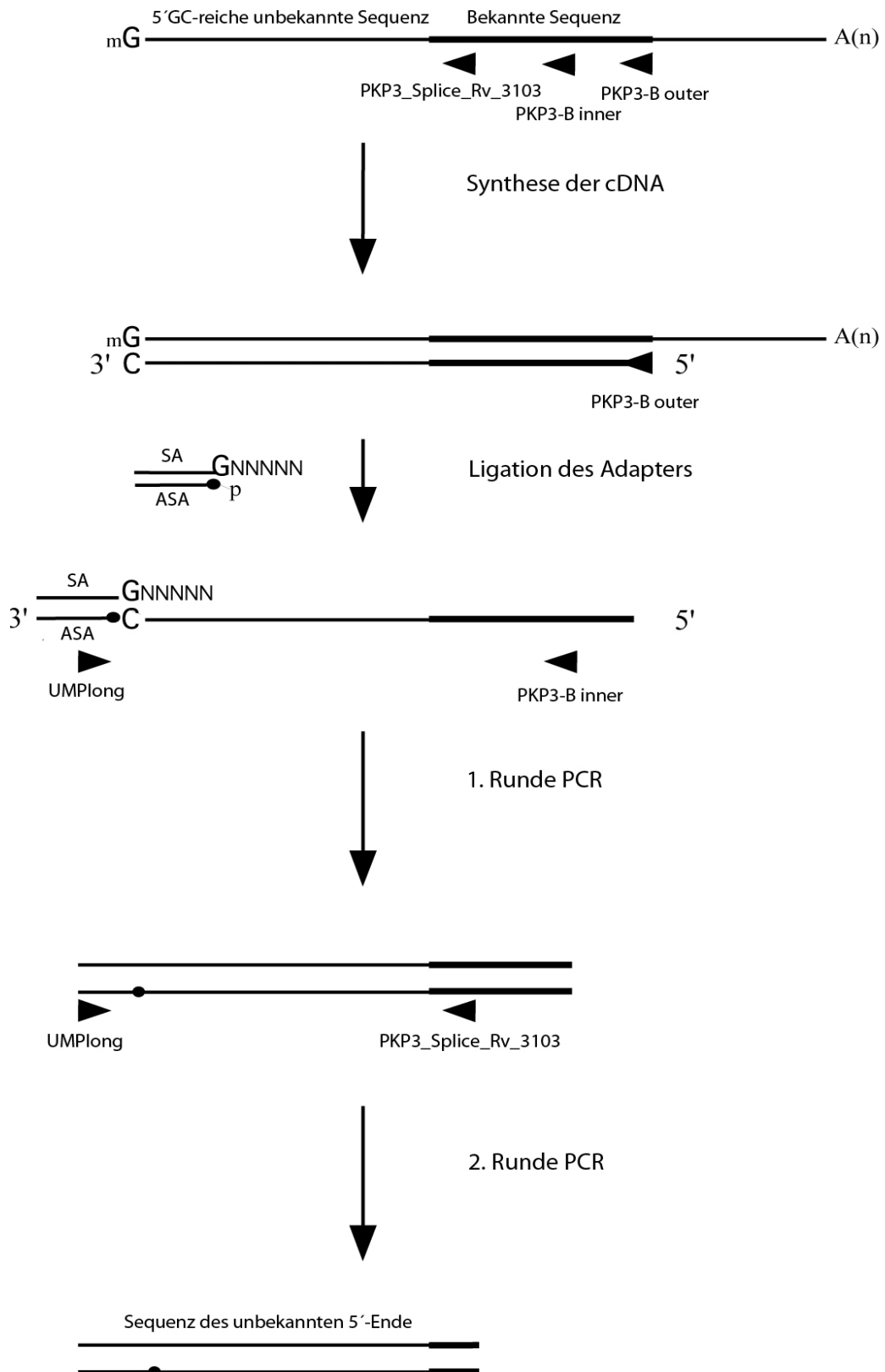


Abb. 3-1 Schematische Darstellung der RACE-Methode nach Shi und Jarvis [86]
Abbildung modifiziert nach Shi und Jarvis [86]. SA = Sense-Adapter; ASA = Antisense-Adapter.

3.2.6 Agarosegel

Agarosegele wurden verwendet, um DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Dabei war zu beachten, dass deren Wanderungsgeschwindigkeit nicht nur von der absoluten Masse, sondern auch der Form abhängig ist. Vor allem bei Plasmiden (superhelikal, offen, doppelsträngig-linear oder einzelsträngig) war dieser Tatsache Rechnung zu tragen.

Durch Aufkochen der Agarose in Puffer wurde diese flüssig und gelierte beim Abkühlen. Ihre Stabilität gewann die Agarose durch Doppelhelices, die sich aus dem Polysaccharidsol beim Abkühlen ausbildeten. Gleichzeitig entstanden relativ große Poren, die ein Wandern der DNA-Moleküle ermöglichten.

Ethidiumbromid, ein organischer Farbstoff mit einer planaren Struktur, wurde eingesetzt, um die DNA im Gel zu visualisieren. Aufgrund der Interaktion der aromatischen Ringe des Ethidiumbromid mit den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nukleinsäuren interkalierte das Ethidiumbromid in die DNA. Wurde es durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt, kam es zur Emission bei 590 nm. Verstärkend wirkte hierbei die Bindung an die DNA, sodass sich die gebundenen Moleküle optisch abhoben und in Verbindung mit einem entsprechenden Größenmarker eine grobe Größenbestimmung der Moleküle ermöglicht wurde.

Die Agarosekonzentration (SeaKem® LE Agarose) wurde abhängig von der Größe des zu erwartenden DNA-Fragments konzentriert: 2 % Agarose (0,1 bis 2 kb) bzw. 1 % Agarose (0,5 bis 10 kb). Für kleine Gele wurde die Agarose in 50 ml, für große Gele in 100 ml 1x TBE durch Aufkochen (Mikrowellenofen) gelöst und nach Zugabe von 1,5 bzw. 3 µl (1,5/3 µg) Ethidiumbromid bei Raumtemperatur geliert. 1 µl der zu analysierenden DNA-Probe wurde mit 9 µl Agarose Auftragspuffer (1:10 verdünnt) gemischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte dann bei 85 Volt mit je nach Größe des Fragments variabler Laufzeit.

10x Agarose Auftragspuffer (für 10 ml)

4 M	Harnstoff
50 mM	EDTA
50 %	Sucrose
0,1 %	Bromphenolblau
0,1 %	Xylencyanol

1kb DNA Ladder (für 500 µl)

40 µl	1 kb DNA Ladder
60 µl	10x Agarose-Ladepuffer
400 µl	ddH ₂ O

100bp DNA Ladder (für 500 µl)

50 µl	100bp DNA Ladder
60 µl	Agarose-Ladepuffer
390 µl	ddH ₂ O

10X TBE

890 mM	Borsäure
25 mM	EDTA
890 mM	Tris-HCl (pH 8)

3.2.6.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegel

Um mit der aufgetrennten DNA weiterarbeiten zu können, wurde diese mit Hilfe eines QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde mittels energiearmen UV-Lichts am UV-Tisch die Bande lokalisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten, um sie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zu überführen. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerangaben des Kits (Qiagen) aufgereinigt. Abweichend vom Protokoll wurde vor dem Eluieren die Säule getrocknet, bis der Ethanol des Waschpuffers verdunstet war. Die Elution von Vektoren erfolgte mit 40 µl EB-Puffer und von *Inserts* mit 25 µl EB-Puffer. Der EB-Puffer wurde für 1 min auf die Säule gegeben, bevor sie für 1 min bei 13.000 rpm

(Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert wurde. Der Zentrifugationsschritt wurde für eine bessere Ausbeute des Eluats wiederholt.

3.2.7 DNA-Klonierung

Um Fragmente genomischer DNA oder spezifische cDNA in großen Mengen zu erhalten, wurde sich der Klonierung bedient. Dazu wurden die zu untersuchenden Sequenzen in sogenannte Klonierungsvektoren eingebaut, mit welchen dann kompetente Bakterien transformiert wurden. Aufgrund der starken Wachstumsrate dieser Bakterien ließen sich innerhalb kürzester Zeit viele Kopien der Vektoren respektive der gewünschten Sequenzen generieren.

3.2.7.1 Restriktionsverdau

Um die gewünschte cDNA-Sequenz (*Insert*) in den Vektor einbauen zu können, war es notwendig, Sequenzabschnitte zu schaffen, die komplementär zu den Enden des Vektors waren. Dazu konnten sogenannte Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) genutzt werden. Diese nutzen für sie charakteristische Nukleotidsequenzen in Doppelstrang-DNA-Molekülen, um an dieser Stelle durch Hydrolyse der entsprechenden Phosphodiesterbindungen die Moleküle aufzutrennen, zu „schneiden“. Folge daraus waren Fragmente, die einen einzelsträngigen Überhang an beiden Enden besaßen. cDNA-*Inserts*, welche mit einem Restriktionsenzym verdaut wurden, waren zu den Überhängen des Vektors komplementär, die mit derselben Nuklease hergestellt worden waren.

Jedes Restriktionsenzym besaß spezifische Pufferbedingungen und Temperaturen, bei denen es optimal arbeitete.

Für den Verdau wurde folgender Reaktionsansatz genutzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert:

1 µl	DNA (1 µg/µl)
2 µl	10 x Restriktionspuffer
x µl	Restriktionsendonuklease (x Einheiten, s. u.)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Eine Einheit (*Unit*) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als diejenige Menge, die 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37 °C vollständig spaltet. Aus der

Anzahl der Schnittstellen in λ -DNA (Herstellerangaben) und der Schnittstellen in der zu untersuchenden DNA ließ sich die benötigte Menge einer Restriktionsendonuklease berechnen:

$$\text{benötigte Einheiten} = 1 \text{ Einheiten} \times \frac{\text{Schnittstellen in DNA}}{\text{Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Der Verdau wurde durch Zugabe von Agarosegel-Ladepuffer gestoppt und der Reaktionsansatz auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, um die gewünschten Fragmente zu isolieren und weiterzuverarbeiten.

3.2.7.2 Dephosphorylierung

Wenn sowohl *Insert* als auch Vektor mit derselben Restriktionsendonuklease geschnitten wurden (ungerichtete Klonierung), konnte es vorkommen, dass aufgrund der komplementären Überhänge der Vektor wieder religiert. Deshalb wurden die an den 5'-Enden vorhandenen Phosphatreste des Vektors mit SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) entfernt, um eine Religation zu verhindern. Das zu inserierende DNA-Fragment wies weiterhin beide Phosphatreste auf, was eine Ligation mit dem dephosphorylierten Vektor ermöglichte. Es wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert:

1 μ l linearisierte DNA (1 μ g/ μ l)
3 μ l 10 x SAP-Puffer
3 μ l SAP (1 Unit/ μ l)
ad 30 μ l ddH₂O

Anschließend erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification System nach Herstellerangaben, um optimale Reinheit der Probe zu erhalten. Die Ausbeute wurde durch zweimaliges Eluieren verbessert.

3.2.7.3 A-Tailing

In dieser Arbeit wurde das Promega pGEM®-T Easy Vektor System II verwendet, um PCR-Fragmente zu klonieren. Da die Vektoren des Systems einen dThymidin-Überhang an ihrem 3'-Ende aufwiesen, war es notwendig, die DNA-Moleküle, an welche noch nicht durch z. B. Verwendung der Taq-Polymerase ein dAdenosin-Rest angefügt wurde, mit einem solchen am 3'-Ende zu versehen. Dazu wurde folgender Ansatz 30 min bei 72 °C inkubiert:

x μ l PCR-Produkt (75 – 100 ng)
3 μ l 10 x PCR-Puffer mit Magnesium
3 μ l dATP (2 mM)
3 μ l Taq-Polymerase (1 Unit/ μ l)
ad 30 μ l ddH₂O

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels des QIAquick PCR Purification System nach Herstellerangaben, wie oben beschrieben.

3.2.7.4 End-Filling

Für die Generierung der vollständigen Variante wurden die einzelnen Fragmente durch Restriktionsverdau mit 5'- und 3'-gelegenen, verschiedenen Restriktionsenzymen ohne kompatible Enden geschnitten. Das verdaute Konstrukt wurde anschließend im präparativen Agarosegel aufgetrennt und nur die jeweilige DNA daraus aufgereinigt (siehe 3.1.8.5). Um eine nachfolgende Religation der Fragmentenden zu ermöglichen, mussten die nicht-kompatiblen Enden geglättet werden. Dies erfolgte durch Inkubation des Konstrukts mit T4-DNA-Polymerase, dNTPs und MgCl₂. Die T4-DNA-Polymerase füllte 5'-Überhänge auf und entfernte aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität 3'-Überhänge, sodass die geglätteten Enden (*blunt ends*) ligiert werden konnten (siehe 3.1.10.5).

Die Reaktion fand für 15 min bei Raumtemperatur in folgendem Reaktionsansatz statt:

x μ l DNA-Konstrukt (entsprechend 1 μ g)
0,3 μ l T4-DNA-Polymerase (3 Einheiten/ μ l)
1,5 μ l dNTPs (100 μ M)
1 μ l MgCl₂ (25 mM)

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels des QIAquick PCR Purification System nach Herstellerangaben, wie oben beschrieben.

3.2.7.5 Ligation

Bei der Ligation werden kompatible Enden durch eine DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. Dieses Enzym kann, während die Überhänge vorübergehend Basenpaarungen eingehen, die Bildung einer 3'→5'-Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende eines Restriktionsfragmentstranges und dem 5'-

Phosphatende eines anderen Restriktionsfragmentstranges unter ATP-Verbrauch katalysieren. Dabei ist sowohl die Anlagerung von geglätteten Enden (*blunt ends*) als auch überhängenden Enden (*sticky ends*) möglich, wobei letztere weniger effizient ist.

Die Ligation erfolgte ü.N. bei Raumtemperatur:

x µl linearisierter Vektor (ca. 20 ng)
x µl *Insert* (ca. 20 ng)
2 µl 10x Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase (400 Einheiten/µl)
ad 20 µl ddH₂O

Hierbei musste beachtet werden, dass Vektor und *Insert* in einem molaren Verhältnis von 3:1 stehen.

Als Kontroll-Ligation wurde ein Ansatz ohne *Insert*-DNA mit inkubiert.

3.2.8 Transformation

Das Einbringen von fremder DNA in eine prokaryotische Zelle wird als Transformation bezeichnet.

3.2.8.1 Chemische Transformation

Der verwendete pGEM®-T Easy Vektor verfügte über ein Ampicillin-Resistenz-Gen, entsprechend sind mit Ampicillin versehene Agarplatten verwendet worden. Der Ligationsansatz wurde kurz zentrifugiert, 2 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Bei -80 °C gelagerte chemisch kompetente Bakterien (*E. coli* JM 109) wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 50 µl der Zellen mit 2 µl Ligationsansatz vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Um nun die Zellmembran der Bakterien punktuell durchgängig zu machen, wurde der Ansatz für 45 s bei 42 °C geführt. So konnte die DNA von den Bakterien aufgenommen werden. Folgend auf den Hitzeschock wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gestellt. Den transformierten Zellen wurde dann 950 µl LB-Medium zugesetzt und anschließend wurden sie für 1,5 h bei 37 °C und 1.500 rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5.000 rpm wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das entstandene Pellet im verbleibendem Medium im Reaktionsgefäß resuspendiert. Der Transformationsansatz

wurde abschließend auf der vorbereiteten Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Am darauf folgenden Tag wurde kontrolliert, ob Kolonien gewachsen sind. Zur Kontrolle wurde immer eine Ligation nur mit Vektor ohne *Insert* angesetzt, welche dann kein Kolonie-Wachstum zeigen sollte.

3.2.8.2 Elektrotransformation

Der Ligationsansatz wurde auf 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren. Anschließend wurden 500 µl n-Butanol hinzugegeben und solange vermischt, bis eine homogene Lösung sichtbar wurde. Um Salzurückstände, welche die Effizienz der Elektrotransformation behindern, aus der Reaktion zu entfernen, wurde für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert und der entstandene Überstand restlos mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Das übrige Pellet wurde auf einem Heizblock bei 37 °C getrocknet, bis das n-Butanol vollständig verdunstet war. Danach wurde es in 20 µl ddH₂O resuspendiert und 4 µl der Ligation in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) vorgelegt und mit 40 µl elektrokompenter Zellen (*E. coli* XL-1 Blue) gemischt. Bis zur Transformation wurde das Zell-Ligationsgemisch für 10 min auf Eis gestellt, bevor das Plasmid durch einen für jede Zellenart spezifischen Stromimpuls (2.000 V, 5 ms) durch einen Elektroporator (Multiporator, Eppendorf) in die Zelle gebracht worden ist. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Eis gestellt und mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Transformationsansatz wurde folgend für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) wurde der Überstand abgegossen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer vorbereiteten Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen. Diese wurden ü.N. bei 37 °C im Brutschrank bebrütet, um am folgenden Tag Kolonien zu picken und zur Plasmid-Präparation anzuimpfen.

3.2.9 Transfektion von Säugerzellen

Im Gegensatz zur Transformation wird das Einbringen fremder DNA in eine eukaryotische Zelle als Transfektion bezeichnet. Hierbei kann zwischen transienter (vorübergehender) und stabiler Transfektion unterschieden werden.

Bei der transienten Transfektion bleibt das Plasmidkonstrukt episomal in der Zelle und wird im Laufe weiterer Zellteilungen soweit ausgedünnt, dass keine Expression mehr feststellbar ist.

Stabile Transfektionen beruhen darauf, dass das eingebrachte Konstrukt durch heterologe Rekombination stabil in das Genom der Zelle eingefügt wird. Dadurch ist eine Weitergabe des Konstrukts gewährleistet. Um stabil transfizierte Zellen zu isolieren, werden meist durch Gabe eines Antibiotikums, gegen welches auf dem benutzten Vektor eine Resistenz kodiert ist, nicht stabil transfizierte Zellen abgetötet. Der hier benutzte pcDNA6-Vektor trägt ein Resistenzgen gegen Blastidicin S.

Um die PLC-Zellen stabil mit dem PKP3a oder PKP3b zu transfizieren, wurden am Vortag der Transfektion ca. 6×10^5 Zellen auf eine 5 cm Schale ausgesät, um am Folgetag eine Konfluenz von 50 % zu erhalten. 24 h später wurde dann die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden je 5 µg der beiden PKP3-Varianten im pcDNA6-Vektor und 10 µl jetPEITM-Lösung in je 250 µl Gesamtvolumen mit 150 mM NaCl gegeben. Nach Vortexen für 10 s und Zentrifugieren wurde die DNA dann der jetPEITM-Lösung hinzugegeben und erneut gevortext, zentrifugiert und dann bei RT 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze tröpfchenweise auf einer Zellkulturschale mit Medium pipettiert und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C, und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen passagiert und dann zu den Schalen Blastidicin S in einer Konzentration von 7,5 µg/ml hinzugegeben, um die transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen zu selektieren.

3.2.10 Präparation von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zu isolieren, mussten die Bakterien nach erfolgreicher Transformation aufgeschlossen werden. Dies erfolgte im kleinen (Minipräparation) oder großen Maßstab (Maxipräparation).

Plasmid-Präparation (Minipräparation) mittels „Alkalischer Lyse“ nach Birnboim und Doly [8]

Mit einem sterilen Zahnstocher wurden 2,5 ml LB-Medium (mit 2 µg/ml Ampicillin) mit Bakterien von einer Agarplatte angeimpft und ü.N. auf einem Schüttler (37 °C; 260 rpm) kultiviert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden dann für 5 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und der Überstand verworfen. Vorhandenes Restmedium wurde entfernt und das Bakterienpellet in 100 µl P1-Puffer (mit 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Danach wurden 200 µl P2-Puffer hinzugefügt und so lange gemischt, bis eine homogene Lösung entstanden war, welche dann mit 150 µl eiskaltem P3-Puffer versetzt, geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem 100 % Ethanol versetzt. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz kurz in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4 °C; Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 µl eiskaltem 70 % Ethanol kurz gewaschen, zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Plasmidpellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

2 µl der Suspension wurden zur Kontrolle mit entsprechenden Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *BamHI*) verdaut und gelelektrophoretisch analysiert, um einen Überblick über den Erfolg der Transformation zu erhalten.

P1-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA
RNaseA mit Endkonzentration 100 µg/ml

P2-Puffer

200 mM NaOH
1 % SDS

P3-Puffer

3 M Kaliumacetat pH 5,5

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4

0,1 mM EDTA

einstellen auf pH 7,5

3.2.10.1 Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation wurde mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi System durchgeführt.

Der Vorteil einer Maxipräparation bestand darin, das gewünschte Plasmid in großer Menge zu produzieren. Dazu wurden 0,5 ml einer Minipräparations-Vorkultur in 100 ml LB-Medium (mit 2 µg/ml Ampicillin) überimpft, ü.N. bei 37 °C auf einem Schüttler (260 rpm) angezüchtet und dann nach Herstellerangaben mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit präpariert. Für eine eventuell anschließende Klonierung wurde am Ende das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, für Transfektionen wurde die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Endotoxin-freien Qiagen-System gereinigt und in 100 µl ddH₂O resuspendiert, da Salze im TE-Puffer die Transfektion behindern konnten.

Die DNA wurde anschließend photometrisch bei 260 nm und 280 nm vermessen und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Auch hier wurde ein Kontroll-Verdau durchgeführt.

Verwendeter Puffer, der nicht im Kit enthalten war:

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4

0,1 mM EDTA

einstellen auf pH 7,5

3.3 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Um die mögliche Spleißvariante des Plakophilin 3 in verschiedenen Zelltypen auf Proteinebene nachzuweisen und eventuelle differente Lokalisationen zu beschreiben, wurden spezifische Antikörper (Ak) gegen die bekannte und die neue Sequenz im Bereich des Aminoterminus des PKP3 generiert. Solche sogenannten Peptidantikörper sind i.d.R. polyklonal (pAk). Sie sind meist gegen funktionell

oder strukturell wichtige Regionen eines Makromoleküls gerichtet und erkennen im Idealfall ein einziges oder nur wenige Epitope.

In unserem Fall wurden synthetische Peptide zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Die hier beschriebenen Versuche mit Versuchstieren wurden beim zuständigen Regierungspräsidium in Gießen angezeigt und unter dem Geschäftszeichen V 54 - 19c 20/15 c MR 20/22 A6/2009 genehmigt.

3.3.1 Herstellung der Oligopeptide

Es wurden die Proteinsequenzen des PKP3a und PKP3b analysiert. Für das PKP3a wurden die ersten 12 Aminosäuren als Epitop, beginnend ab dem Start-Methionin genutzt, für das PKP3b die ersten 27 Aminosäuren ab dem möglichen Start-Methionin. Beide Aminosäureabfolgen wurden mit Hilfe des *Antigenic*-Programms des HUSAR Bioinformatics Lab (DKFZ, Heidelberg) auf ihre Antigenität überprüft und anschließend durch die Firma PSL (Heidelberg) in einer Stocklösung (2 mg/ml) synthetisiert und über die artifiziell angefügte Aminosäure Cystein mittels der Sulfhydryl-Gruppe an aktiviertes KLH gekoppelt.

3.3.2 Immunisierung

Die Immunisierung wurde dreimalig durchgeführt. Es wurden zwei männliche Kaninchen mit dem PKP3a-Peptid und zwei männliche mit dem PKP3b-Peptid immunisiert. Zur ersten Immunisierung wurden etwa 150 µg Peptid-Antigen auf 250 µl Volumen mit PBS pro Tier gebracht und mit dem gleichen Volumen „Kompletten Freundschens Adjuvans“ (Sigma-Aldrich) versetzt. Durch wiederholtes Aufziehen in einer Kanüle wurden beide Flüssigkeiten emulgiert. Anschließend wurde das Emulgat dem Versuchstier an 3 Stellen am Rücken subkutan appliziert. 3 Wochen später wurde eine sogenannte *Booster*-Immunisierung mit 100 µg Antigen in „Inkomplettem Freundschens Adjuvans“ (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Hier wurden 2 Injektionen pro Kaninchen durchgeführt. Ebenfalls 3 Wochen später wurde die letzte *Booster*-Immunisierung mit ebenfalls 100 µg Antigen in „Inkomplettem Freundschens Adjuvans“ (Sigma-Aldrich) durchgeführt und jedem Tier Testblut aus der Ohrvene entnommen, um den Titer an spezifischem Ak zu bestimmen (z.B. durch *Western Blot*). Bei ausreichendem Titer, was

in den hier durchgeführten Experimenten der Fall war, wurde das Versuchstier 10 Tage nach der letzten *Booster*-Injektion entblutet.

Aus dem Blut wurde nach Gerinnung das Serum durch Zentrifugation (3.500 rpm, 15 min, 4 °C) abgetrennt, mit Natriumazid (0,01 %) versetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.4 Proteintechniken

3.4.1 Proteinmessung

Um die Proteinkonzentration eines Zelllysats zu bestimmen, wurde routinemäßig das *Bradford*-Reagenz von Bio-Rad verwendet. Das *Bradford*-Reagenz hatte den blauen Azofarbstoff *Coomassie*-Brillantblue als Bestandteil, welcher unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten des Proteins, vor allem an Arginin und weniger an Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bindet. Dadurch wurde der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung mit dem Protein stabilisiert und dessen Adsorptionsmaximum verschob sich von 465 nm zu 595 nm, welches photometrisch bestimmt wurde.

3.4.2 SDS-PAGE/ Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

Diese Methode wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht genutzt. Dazu wurde SDS, ein anionisches Detergenz, eingesetzt, welches die Eigenladung von Proteinen mit einer konstanten negativen Ladung pro Masseneinheit überdeckte, so dass die Proteine nur auf Grund ihrer Größe im Gel getrennt wurden.

Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche Elektrophorese mit Sammel- und Trenngel durchgeführt. Das weitmaschige Sammelgel wurde in einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach [52] durchgeführt. Auf Grund der Tatsache, dass der pH-Wert des Puffers nahe am pI des Glycins liegt und sich somit dieses nur langsam durch das Gel bewegt, wird Glycin als Folge-Ion bezeichnet. Die Chlorid-Ionen, welche jedoch schneller durch die Gelmatrix wandern, werden analog als Leit-Ionen bezeichnet. Die aufzutrennenden Proteine laufen zwischen den Leit- und Folge-Ionen. Dabei folgen Protein-Ionen mit der höchsten Mobilität

dem Leit-Ion, während die mit der niedrigsten Mobilität vor den Folge-Ionen hergeschoben werden. Dieses Prinzip wird *Stacking*-Effekt genannt. Da an der Grenzschicht zum engporigeren Trenngel ein Reibungswiderstand auftritt, stauen sich die Proteine zusätzlich und eine Zonenschärfung entsteht. Glycin selber bleibt davon unbeeinflusst und überholt die Proteine.

Im Trenngel löst sich der Proteinstapel auf und Proteine trennen sich ihrer Größe nach auf. Kleinere Proteine wandern besser durch die Gelporen und somit schneller in Richtung Anode. Mit Hilfe von Standardproteinen bekannten Molekulargewichts lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Acrylamid, welches mit Bisacrylamid (37,5:1) quervernetzt, war die Grundlage bei der Herstellung beider Gele. Die Polymerisation wurde durch den Zerfall von Peroxodisulfationen (APS) initiiert, sodass eine Radikalkettenreaktion startete, die Tetramethylethylendiamin (TEMED) aktivierte. Dadurch wurde die Vernetzung eingeleitet. Wichtig war, dass die Polymerisation unter Luftabschluss stattfindet, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führte.

Die Gele wurden nach den Angaben in Tab. 3-1 und Tab. 3-2 hergestellt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Ethanol überschichtet, um Luftsauerstoff abzuschirmen und die Kontaktfläche zum Sammelgel zu begradigen. Das Sammelgel wurde hinzugegeben, nachdem das Trenngel auspolymerisiert und der Ethanol entfernt worden war. Ein Kamm zur Taschenbildung wurde in das noch flüssige Sammelgel gesteckt.

Als Proben wurden Gesamt-Proteinextrakte aus PLC-Zellen, jeweils transfiziert mit PKP3a oder PKP3b und untransfiziert (Wildtyp PLC) aufgetragen. Zusätzlich wurden Gesamt-Proteinextrakte aus A431-, HaCaT- und CaCo2-Zellen aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1x Laemmli-Ladepuffer auf 20 µl aufgefüllt und auf 95 °C zur Denaturierung der Proteine aufgeköcht.

Tab. 3-1 Trenngel (für 30 ml)

	12 %
Acrylamid (Protogel 30)	12 ml
<i>Lower Tris</i>	7,5 ml
H ₂ O	10,4 ml
TEMED	30 µl
10 % APS	300 µl

Tab. 3-2 Sammelgel (für 10ml/20ml)

	3,6 %
Acrylamid (Protogel 30)	1,3 ml
<i>Upper Tris</i>	2,5 ml
H ₂ O	6,2 ml
TEMED	30 µl
10 % APS	100 µl

4x Laemmli *Upper Tris* (auf pH 6,8 mit HCl eingestellt und steril filtriert)

0,5 M Tris Base

0,4 % SDS

ad ddH₂O 100 ml

4x Laemmli *Lower Tris* (auf pH 8,8 mit HCl eingestellt und steril filtriert)

1,5 M Tris Base

0,4 % SDS

ad ddH₂O 100 ml

10x Lauffpuffer (auf pH 8,3 in 1x Puffer mit Glycin eingestellt)

250 mM	Tris Base
2,5 M	Glycin
1 %	SDS

4x Laemmli-Ladepuffer (für 10 ml)

15 %	Glycerol
4 %	SDS
20 %	β -Mercaptoethanol
1x Sammelpuffer <i>Upper-Tris</i>	
+ einige Krümel Bromphenolblau	

3.4.3 Protein-Blot (*Western Blot*)

Um ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters auf eine Nitrocellulose-Membran zu bekommen, wurden sogenannte Nass-Blots genutzt. Ziel war es, die aufgetrennten Proteine möglichst vollständig aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran zu transferieren. An dieser Membran konnten die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und schwache elektrostatische Kräfte binden.

Dazu wurde das Gel nach beendetem Lauf für 10 min im Nass-Blot-Puffer äquillibriert, um freies SDS im Gel zu reduzieren und somit die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit der Membran zu verstärken. Die Transfereinheit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Wichtig war, keine Luftblasen zwischen Membran und dem Gel zu haben, da hier kein Stromfluss und somit kein Transfer von Proteinen möglich war. Danach wurde die Transfereinheit in den Tank eingesetzt. Zu beachten war die Ausrichtung der Membran Richtung Anode und des Gels Richtung Kathode, um die durch SDS negativ maskierten Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern zu lassen. Der verwendete Boratpuffer erlaubte kürzere Transferzeiten durch höhere Stromstärken. Es wurde für 1 h bei 500 mA unter kontinuierlichem Rühren des Puffers geblottet.

1x Nass-Blot-Puffer (auf pH 8,8 eingestellt)

20mM	Borsäure
1mM	EDTA

3.4.3.1 Ponceau S-Färbung

Um die Effektivität des Transfers zu kontrollieren, wurden die Proteine auf der Membran reversibel mit dem sauren Azofarbstoff Ponceau S für 30 s angefärbt. Aufgrund geringer Sensitivität (Nachweisgrenze 250 ng - 500 ng) dieser Färbemethode diente sie nur der groben Abschätzung des Proteingehalts.

3.4.3.2 Immunoblotting / Immunbiochemischer-Nachweis

Als Immunoblotting bezeichnet man den Nachweis elektrophoretisch getrennter Proteine mithilfe von spezifischen Antikörpern.

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit ihren Verdünnungen aus Tab. 2-1 und Tab. 2-2 zu entnehmen.

Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktionen mussten vor der eigentlichen Immunreaktion unspezifische Bindungsstellen auf der Membran möglichst vollständig blockiert werden. Hierzu wurde 5 % (w/v) Magermilchpulver (unspezifisches Proteingemisch) in 1x TBST verwendet, welches ü.N. bei 4 °C mit der Membran inkubiert wurde.

Nach der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde diese mit dem primären Ak für 1h inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min mit 1x TBST gewaschen, um nicht gebundene Ak zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für wiederum 1 h mit dem sekundären Ak inkubiert und abschließend wie oben 3x 10 min gewaschen.

3.4.3.3 *Enhanced Chemiluminescence* Immunreaktion zur Detektion von Proteinen

Die Detektion der auf die Membran übertragenen Proteine erfolgte mittels einer Antikörper-basierten Immunreaktion durch einen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Die indirekt an das Zielprotein gekoppelte Peroxidase katalysierte die Oxidation von Luminol, welches auf ein höheres Energieniveau angeregt wurde. Bei Rückkehr in den Normalzustand wurden Photonen abgegeben (Chemilumineszenz), die einen lichtempfindlichen Film schwärzten. In der *Enhancer*-Lösung waren die Reaktion verstärkende Phenole enthalten.

1 ml der Peroxidase-Lösung (SuperSignal West Pico, Pierce) wurden mit 1 ml der *Enhancer*-Lösung gemischt und die Membran damit für 5 min bei RT inkubiert.

Dann wurde die Lösung abgenommen, die Membran in Folie eingeschweißt und im Entwickler entwickelt.

3.5 Immunfluoreszenz

Als Immunfluoreszenz wird die selektive Markierung bestimmter zellulärer Strukturen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper bezeichnet, die eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Die hier verwendete indirekte Immunfluoreszenz wies einen gebundenen Primärantikörper durch Zugabe eines Spezies-spezifischen Zweitantikörpers nach, der einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff trug.

Die verwendeten Zelllinien wurden zuerst wie unter 3.1.3 beschrieben fixiert. Die Fixierung des verwendeten Gewebes ist unter 3.1.3.2 aufgeführt. Um den Antikörpern den Zugang zu den antigenen Strukturen zu ermöglichen, wurden die bei -20 °C gelagerten Zellen aufgetaut und kurz in PBS mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 getaucht. Das Detergenz wurde genutzt, um die kompakten fixierten Zellstrukturen für die Penetration des Primärantikörpers zugänglicher zu machen.

Der Primärantikörper wurde auf die gewünschte Verdünnung (siehe Tab. 2-1) mit PBS verdünnt und auf einem Stück Parafilm in einer feuchten Kammer vorgelegt. Die Plättchen wurden mit der Zellseite für 1 h mit dem Ak inkubiert und danach vom überschüssigen Ak (3x 15 min mit PBS) befreit. Der Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper, welcher spezifisch gegen die Spezies des primären Ak gerichtet war, wurde ebenfalls mit PBS auf die benötigte Verdünnung eingestellt (siehe Tab. 2-2) und in der feuchten Kammer auf Parafilm vorgelegt. Wieder wurden die Plättchen mit der Zell-behafteten Seite für 30min mit dem Ak im Dunkeln inkubiert, damit der Fluoreszenzfarbstoff nicht ausbleicht. In den letzten fünf Inkubationsminuten wurde dem Sekundärantikörper DAPI-Farbstoff zugegeben, welcher spezifisch die DNA im Kern anfärbte. Anschließend wurde überschüssiger Sekundärantikörper erneut 3x für 15 min mit PBS abgespült. Die so gefärbten Zellplättchen wurden mit Fluoromount G auf einem Objektträger eingedeckt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Analyse der verschiedenen Zellen und Gewebe erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss) und dem 63x Objektiv Planapochromat von

Carl Zeiss. Die verwendete Kamera ORCAII ER wurde mit der Software SimplePCI (beides Hamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee) gesteuert.

3.6 Immunhistochemie

Gewebeaufbereitung

Um die Paraffinblöcke leichter zu bearbeiten, wurden sie ca. 20 min bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden mit einem Schlitten-Mikrotom (SM 2000 R, Leica) ca. 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-plus-Glasobjektträger (Menzel) gezogen. Zum Trocknen wurden sie bei 60 °C für mindestens 60 min im Brutschrank eingelagert.

Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Zuerst wurden die Schnitte 4x 10 min in Xylol gestellt und dann durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 100 %, 96 %, 96 %, 70 %, 50 %) gezogen, um sie zu entparaffinieren und rehydrieren. Nach Spülen mit A. dest. erfolgte die Antigen-Demaskierung, indem die Schnitte mit 4 °C kaltem Citratpuffer (pH 6,0) aufgefüllt und bei 115 °C im Mikrowellenofen (Hacker-Milestone) für 3 min erhitzt wurden. Anschließend wurden die Schnitte bei RT abgekühlt und mit 1x Waschpuffer (Dako; 1:10 verdünnt mit A. dest.) gewaschen und in den Autostainer (Dako) überführt.

Avidin-Biotin-Methode

Dort wurde zuerst die endogene Peroxidase mit Hilfe der REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako) für 5 min blockiert und mit 1 x Waschpuffer (Dako) gespült.

Dann wurden die Primärantikörper entsprechend in REAL™ Antibody Diluent (Dako) verdünnt (Tab. 2-1), 100 µl aufgetragen und für 1 h bei RT inkubiert, um ihre spezifischen Antigene zu binden. Anschließend wurde mit 1x Waschpuffer gespült, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

100 µl des Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (REAL™ Link, biotinylated secondary antibodies, Dako) wurden für 15 min aufgetragen, damit der Sekundär-

antikörper den Primärantikörper binden konnte. Der folgende Waschschrift mit Waschpuffer diente dem Entfernen von nicht gebundenem Antikörper.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl Streptavidin-Peroxidase (REAL™ Streptavidin Peroxidase, Dako) dazugegeben und für 15 min inkubiert. Dieser Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Komplex kann mit seinen freien Bindestellen des Avidins Biotin-Moleküle am Sekundärantikörper binden, um diese nachzuweisen. Nach erneutem Spülen mit 1 x Waschpuffer, um die nicht gebundenen Komplexe zu entfernen, wurden die Schnitte der Detektion zugeführt. Dazu wurden das Chromogen DAB+ und der Substrat-Puffer (Dako) für 2x 5 min zugegeben. Diese bildeten, vermittelt durch die Peroxidase eine bräunliche, in Alkohol unlösliche Farbe aus. A. dest. stoppte die Reaktion. Da es notwendig war, die Zellen sichtbar zu machen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Nach sechsmaligem Eintauchen in Hämalaun wurde auch diese Reaktion durch Spülen mit Leitungswasser abgestoppt/gebläut.

Abschließend wurden die Schnitte zur Entwässerung in eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht, dann 5 min in 100 % Ethanol und 3 min in 100 % Xylol inkubiert. Die Objektträger wurden mit Hilfe von Entellan und Deckgläsern eingedeckt und waren nun zur Auswertung nutzbar.

Die Analyse des Gewebes erfolgte mit dem DMRB Durchlicht-Mikroskop (Leica) und einem 40x Objektiv.

3.7 Bildbearbeitung

Für die Anordnung, Kontrastierung und Aufhellung der in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurde Adobe® Photoshop Version 7.0.1 (Adobe Systems, München) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung möglicher Varianten von PKP3

Bei *Western Blot*-Analysen von Plakophilin 3-Protein fiel gelegentlich auf, dass mit spezifischen monoklonalen Antikörpern zwei Proteine von etwa 87 kDa mit einem geringen Laufunterschied erkannt wurden (A. Schmidt, persönliche Mitteilung). Die zusätzliche Bande legte die Vermutung nahe, dass es eine Isoform von PKP3 gibt. Tatsächlich wurden bei den beiden anderen Plakophilinen ebenfalls eine alternative Spleißvariante nachgewiesen [60, 83]. Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis von Isoformen des Plakophilin 3-Gens sowie deren Charakterisierung auf RNA- und Proteinebene. Gerade im Hinblick auf die Rolle von Plakophilin 3 in der Tumorgenese [1, 26] ist die Identifikation einer Isoform von großem medizinischem Interesse.

4.1.1 Sequenzsuche in öffentlichen Datenbanken

Zunächst wurden öffentliche Datenbanken wie die GenBank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) nach sogenannten *expressed sequence tags*-Klonen (EST) durchsucht, die Abweichungen zur cDNA-Sequenz von PKP3 aufweisen. EST-Klone stellen willkürlich isolierte cDNAs dar, deren Termini ansequenziert wurden und damit das Transkriptom eines bestimmten Zelltyps oder Gewebes repräsentieren. Hierunter befinden sich auch cDNAs, die nicht prozessierten mRNAs oder Varianten einer mRNA entsprechen können. Für die Suche ausschlaggebend war die bekannte Sequenz des humanen Plakophilin 3. Unter den cDNA-Sequenzen wurde unter anderem die des Klons DA439471.1 (Abb. 4-1) identifiziert, welcher für eine weitergehende Analyse auf Grund folgender Eigenschaft besonders interessant erschien [46]: eine bislang unbekannte Sequenz fand sich hier am 5'-Ende der bekannten cDNA-Sequenz und ersetzte einen Teil der bisher veröffentlichten Sequenzen inklusive des Startkodons. Diese cDNA aus mRNA von Tumorgewebe der humanen Zunge ist im Zuge einer Suche nach putativen alternativen Promotoren für die Expression humaner Gene isoliert worden. Dabei wurde auf eigens hergestellte cDNA-Bibliotheken aus unterschiedlichen

Gewebe zurückgegriffen, die mit Hilfe einer eigenen Methode generiert worden sind [95].

```

1  GCGCCGGGCC AGGGATGGAG TCCTGGACAC CTCGGCCGTC AGCAGTGGCC TCTGGGATGA
61  GCTGGGAGGC TGGCGGGATC CGGACCACGA GCCGGCCTGA GGCCGGCGTG TGCTCCCTAG
121 CGCTGCCCTC TGACCTGCAG CTGGACCGCC GGGGCGCCGA GGGGCCGGAG GCCGAGCGGC
181 TCGGGGCAGC CCGCGTCCAG GAGCAGGTCC GCGCCCGCCT CTGTCAGCTG GGACAGCAGC
241 CGCGGCACAA CGGGGCCGCT GAGCCCCAGC CTGAGGCCGA GACTGCCAGA GGCACATCCA
301 GGGGGCAGTA CCACACCCTG CAGGCTGGCT TCAGCTCTCG CTCCCAGGGC CTGAGTGGGG
361 ACAAGACCTC GGGCTTCCGG CCCATCGCCA AGCCGGCCTA CAGCCNGCC TCCTGGTCCT
421 CCCGCTCCGC CGTGGATCTG AGCTGCAGTC GGAGGCTGAG TTCAGCCCAC AATGGGGGCA
481 GCGCCTTTGG GGCCGCTGGG TACGGGGGTG CCCAGCCCAC CCCTCCCATG CCCACCAGGC
541 CCGTGTC

```

Abb. 4-1 Nukleotidsequenz des EST-cDNA-Klons DA439471.1

Abgebildet ist die 547 Basen lange Sequenz des EST-Klons. Rot markiert sind Nukleotide, die sich in der bisher bekannten mRNA-Form von PKP3 nicht finden, während bereits bekannte Sequenzen schwarz dargestellt sind. Mögliche Startkodons sind mit hellblau markiert. Mit N ist ein beliebiges Nukleotid gekennzeichnet.

Die Sequenz dieses cDNA-Klons wurde mit der genomischen Sequenz im Bereich des Plakophilin-3-Gens verglichen, um den Übergang der unbekannten zur bekannten Sequenz auf mögliche Spleißstellen zu untersuchen. Spleißstellen stellen Endsequenzen eines Intron an der Grenze zu einem Exon dar und weisen häufig eine charakteristische Konsensus-Sequenz am 5'- und 3'-Ende des Introns auf. Auf Seiten des Spleiß-Donors des Introns findet sich meist ein Guanin und Thymin (A₆₄G₇₃-g₁₀₀t₁₀₀a₆₂a₆₈g₈₄t₆₃; Intron-Donor in Kleinbuchstaben mit Prozentangaben des Auftretens der Nukleotide in Spleißstellen; nach [75]) und am Spleiß-Akzeptor ein Adenin und Guanin ([PyPyPyPyPyPy]₇₄₋₈₇nc₆₅a₁₀₀g₁₀₀N; Intron-Azeptor in Kleinbuchstaben, Py=Pyrimidin, N=beliebiges Nukleotid; nach [75]; „GT-AG“-Regel).

Die BLAST-Analyse der neu gefundenen cDNA-Sequenz mit der menschlichen Genomsequenz ergab, dass sie sich in etwa 2 kb Entfernung vor der bislang bekannten Gensequenz von PKP3 befindet. An der Stelle, an der die neu gefundene cDNA-Sequenz abbrach, fand sich in der genomischen Fortsetzung eine potentielle Spleiß-Donorstelle (CGGgtaggt; siehe Abb. 4-2), die der Konsensus-Sequenz von Donorstellen entsprach. Der Vergleich des Bereiches, an dem die neu gefundene Sequenz in die bereits bekannte Sequenz übergang, wurde ersichtlich, dass sich diese bereits im kodierenden Bereich der bekannten cDNA-Sequenz von PKP3 befand. Hier fand sich am Übergang eine potentielle Spleiß-Akzeptorsequenz (ggccctgcagCCT; siehe Abb. 4-2). Durch das Einspleißen der neu gefundenen Sequenz wurden das bislang genutzte Startkodon für Methionin

und die folgenden elf Aminosäuren entfernt. Die neu identifizierte Sequenz wies ebenfalls ein mögliches Startkodon auf, das im Leserahmen lag, und kodierte für eine bislang unbekannte Aminosäure-Sequenz von 27 Aminosäuren. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 4-2 zusammengefasst. Es bestand gemäß der *in-silico*-Analyse demnach die Möglichkeit, dass es sich bei dem gefundenen cDNA-Klon um eine neue Variante des *PKP3*-Gens handelte. Der Vereinfachung halber wird die bislang bekannte Variante ab nun als PKP3a, die neu identifizierte Variante als PKP3b bezeichnet, analog den Bezeichnungen für Plakophilin 1 und 2 [65].

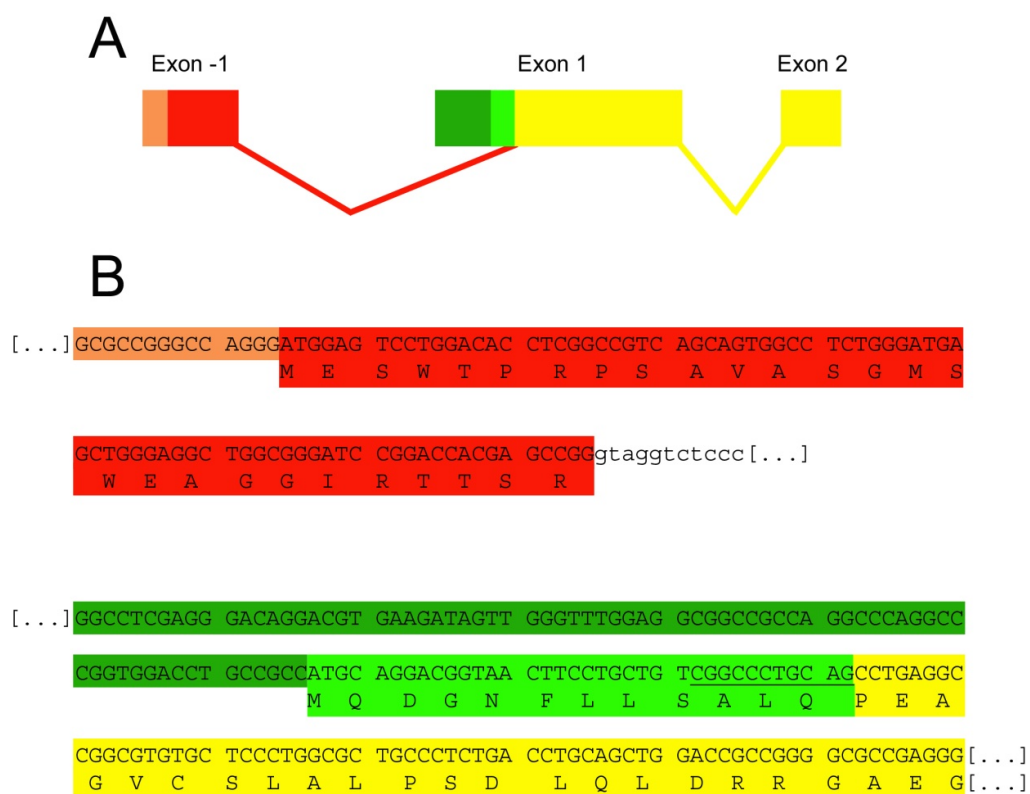


Abb. 4-2 Schema der genomischen Organisation (A) und Sequenzen der möglichen Varianten (B) des PKP3-Gens

Das 5'-Ende der bekannten PKP3 cDNA ist grün (kodierender Bereich in Hellgrün), das 5'-Ende der neuen Variante rot-orange (kodierender Bereich rot) dargestellt, während die Sequenzen, die beide teilen, gelb markiert sind. Die daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt. Die Spleißdonor-Stelle ist in Kleinbuchstaben dargestellt und die Spleißakzeptorstelle ist unterstrichen. Letztere befindet sich innerhalb der kodierenden Sequenz des bekannten PKP3. Das zweite ATG der möglichen Spleißvariante wurde nicht extra gekennzeichnet.

4.1.2 Nachweis der mRNA einer Variante des PKP3-Gens

Um zu überprüfen, ob Desmosomen-ausbildende Zellen die mögliche Isoform PKP3b exprimierten, wurden entsprechende Transkriptome analysiert. Wenn die neue Variante als mRNA vorliegt, sollte sich diese als cDNA nachweisen lassen.

Dafür wurde Gesamtzell-RNA aus A431-Zellen isoliert, mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und per RETROscript® Kit (Ambion) in cDNA umgeschrieben. Aus diesem cDNA-Pool wurden dann mittels PCR (Phusion™ DNA-Polymerase; New England Biolabs) und PKP3-spezifischen *Primern* (Tab. 2-3) die spezifischen cDNAs amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die Sequenz des Vorwärts-*Primers* komplementär an einen Sequenzbereich aus der neu gefundenen Sequenz binden sollte. Die Sequenz der Gegenstrang-*Primer* sollte einen Sequenzbereich binden, der beiden möglichen Isoformen gemeinsam war. Die Gegenstrang-*Primer* wurden so gewählt, dass sich daraus Amplifikate von etwa 600 bp, 1.200 bp, 1.800 bp und 2.400 bp ergaben. Es sollte untersucht werden, ob eine komplette mRNA der Isoform PKP3b (das 2.400 bp lange Amplifikat umfasst den gesamten kodierenden Bereich der neuen Variante) nachweisbar ist. Die PCR-Reaktionen wurden bei den angegebenen Temperaturen, bei einer DMSO-Konzentration von 13 % durchgeführt (siehe 3.2.4). Diese relativ hohe Konzentration hat sich in Verdünnungsreihen am effektivsten herausgestellt.

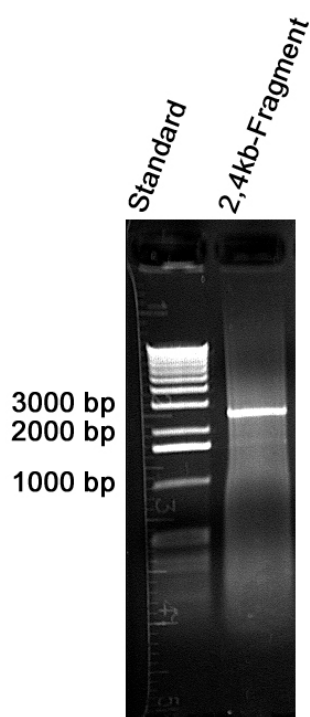


Abb. 4-3 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Reaktion für die komplette cDNA der Variante PKP3b

Dargestellt ist elektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion mittels eines 0,8 %igen Agarose-Gels (rechte Spur) zusammen mit einem Größenstandard (1 kb-Leiter; Invitrogen). Durch die PCR wurde ein ca. 2500 bp großes DNA-Fragment amplifiziert.

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4-3) und diese dann in den Plasmid-Vektor pGEM®-T Easy (Promega) kloniert. Die klonierten Fragmente wurden anschließend sequenziert (Andreas Hunziker, DKFZ, Heidelberg).

```

1  GCGCCGGGCC AGGGATGGAG TCCTGGACAC CTCGGCCGTC AGCAGTGGCC TCTGGGATGA
61  GCTGGGAGGC TGGCGGGATC CGGACCACGA GCCGGCCTGA GGCCGGCGTG TGCTCCCTGG
121 CGCTGCCCTC TGACCTGCAG CTGGACCGCC GGGGCGCCGA GGGGCCGGAG GCCGAGCGGC
181 TGCGGGCAGC CCGCGTCCAG GAGCAGGTCC GCGCCCGCCT CTTGCAGCTG GGACAGCAGC
241 CGCGGCACAA CGGGGCCGCT GAGCCCGAGC CTGAGGCCGA GACTGCCAGA GGCACATCCA
301 GGGGGCAGTA CCACACCCTG CAGGCTGGCT TCAGCTCTCG CTCTCAGGGC CTGAGTGGGG
361 ACAAGACCTC GGGCTTCCGG CCCATCGCCA AGCCGGCCTA CAGCCCAGCC TCCTGGTCCT
421 CCCGCTCCGC CGTGGATCTG AGCTGCAGTC GGAGGCTGAG TTCAGCCAC AATGGGGGCA
481 GCGCCTTTGG GCGCGCTGGG TACGGGGGTG CCCAGCCAC CCCTCCCATG CCCACAGGC
541 CCGTGTCCTT CCATGAGCGC GGTGGGGTTG GGAGCCGGGC CGACTATGAC ACACTCTCCC
601 TGCGCTCGCT GCGGCTGGGG CCCGGGGGCC TGGACGACCG CTACAGCCTG GTGTCTGAGC
661 AGCTGGAGCC CGCGGCCACC TCCACCTACA GGGCCTTTGC GTACGAGCGC CAGGCCAGCT
721 CCAGCTCCAG CCGGGCAGGG GGGCTGGACT GGCCCGAGGC CACTGAGGTT TCCCCGAGCC
781 GGACCATCCG TGCCCCCTGC GTGCGGACCC TGCAGCGATT CCAGAGCAGC CACCGGAGCC
841 GCGGGGTAGG CGGGGCAGTG CCGGGGGCCG TCCTGGAGCC AGTGGCTCGA GCGCCATCTG
901 TGCGCAGCCT CAGCCTCAGC CTGGCTGACT CGGGCCACCT GCCGGACGTG CATGGGTTCA
961 ACAGCTACGG TAGCCACCGA ACCCTGCAGA GACTCAGCAG CGGTTTTGAT GACATTGACC
1021 TGCCCTCAGC AGTCAAGTAC CTCATGGCTT CAGACCCCAA CCTGCAGGTG CTGGGAGCGG
1081 CCTACATCCA GCACAAGTGC TACAGCGATG CAGCCGCCAA GAAGCAGGCC CGCAGCCTTC
1141 AGGCCGTGCC TAGGCTGGTG AAGCTCTTCA ACCACGCCAA CCAGGAAGTG CAGCGCCATG
1201 CCACAGGTGC CATGCGCAAC CTCATCTACG ACAACGCTGA CAACAAGCTG GCCCTGGTGG
1261 AGAGAAGACG GATCTTCGAG CTGCTGCGGA CACTGCGGGA GCAGGATGAT GAGCTTCGCA
1321 AAAATGTAC ACAGGATCCTG TGAACCTTT CATCCAGCGA CCACCTGAAG GACCCGCTGG
1381 CCAGAGACAC GCTGGAGCAG CTCACAGACC TGGTGTTGAG CCCCTGTGCG GGGGCTGGGG
1441 GTCCCCCCT CATCCAGCAG AACGCCTCGG AGGCAGAT CTTCTACAAC GCCACCGCT
1501 TCCTCAGGAA CCTCAGCTCA GCCTCTCAGG CCACTCGCCA GAAGATGCGG GAGTGCCACG
1561 GGCTGGTGGA CGCCCTGGTC ACCTCTATCA ACCACGCCCT GGACGCGGGC AAATGCGAGG
1621 ACAAGAGCGT GGAGAACGCG GTGTGCGTCC TGCGGAACCT GTCCTACCGC CTCTACGACG
1681 AGATGCCCGC GTCCGCGCTG CAGCGGCTGG AGGGTCGCGG CCGCAGGGAC CTGGCGGGGG
1741 CGCCGCCGGG AGAGGTGCTG GGCTGCTTCA CGCCGCAGAG CCGGCGGCTG CGCGAGCTGC
1801 CCCTCGCCGC CGATGCGCTC ACCTTCGCGG AGGTGTCCAA GGACCCCAAG GGCTCGAGT
1861 GGCTGTGGAG CCCCAGATC GTGGGGCTGT ACAACCGGCT GCTGCAGCGC TGCGAGCTCA
1921 ACCGGCACAC GACGGAGGCG GCGCCGGGGG CGCTGCAGAA CATCACGGCA GGCGACCGCA
1981 GGTGGGCGGG GGTGCTGAGC CGCCTGGCCC TGGAGCAGGA GCGTATTCTG AACCCTCTGC
2041 TAGACCGTGT CAGGACCGCC GACCACCACC AGCTGCGCTC ACTGACTGGC CTCATCCGAA
2101 ACCTGTCTCG GAACGCTAGG AACAAGGACG AGATGTCCAC GAAGGTGGTG AGCCACCTGA
2161 TCGAGAAGCT GCCAGGAGC GTGGGTGAGA AGTCGCCCCC AGCCGAGGTG CTGGTCAACA
2221 TCATAGCTGT GCTCAACAAC CTGGTGGTGG CCAGCCCCAT CGCTGCCCGA GACCTGCTGT
2281 ATTTTGACGG ACTCCGAAAG CTCATCTTCA TCAAGAAGAA GCGGGACAGC CCCGACAGTG
2341 AGAAGTCCTC CCGGGCAGCA TCCAGCCTCC TGGCCAACCT GTGGCAGTAC AACAAGCTCC
2401 ACCGTGACTT CCGGGCGAAG GGCTATCGGA AGGAGGACTT CCTGGGCCCC TAGGTGAAGC
2461 CTTCTGGAGG AGAAGGTGAC GTGGCCACAG GTCCAAGGGA CAGAC

```

Abb. 4-4 Sequenz des cDNA-Klons #10 der Variante PKP3b

Die dargestellte Sequenz ist ca. 2,5 kb lang. Die roten Buchstaben stellen den neuen Sequenzabschnitt analog zum DA439471.1-Klon dar. Das blau markierte ATG (mRNA = AUG) stellt das potentielle Startkodon, das blau markierte TAG (mRNA = UAG) das Stoppkodon dar. Die rot hinterlegten einzelnen Nukleotide weisen auf die gefundenen SNPs hin. Unterstrichen sind die benutzten *Primer*-Sequenzen.

Die Sequenzen der untersuchten cDNA-Klone bestätigten alle die Existenz einer mRNA der neuen Variante und wiesen keine weitere Veränderung außer dem Auftreten von sogenannten SNP (*single nucleotide polymorphisms*) auf. Die Se-

quenz des längsten gefundenen cDNA-Klons der Variante PKP3b ist in Abb. 4-4 dargestellt.

```

1 .....MQDGNFLLSALQPEAGVCSLALPSDLQLDRRGAEGPEAERLRAARVQEQVRARLL 55
1 MESWTPRPSAVASGMSWEAGGIRTTTSRPEAGVCSLALPSDLQLDRRGAEGPEAERLRAARVQEQVRARLL 70
56 QLGQQPRHNGAAEPEPEAETARGETSRGQYHTLQAGFSSRSQGLSGDKTSGFRPIAKPAYSPASWSSRSV 125
71 QLGQQPRHNGAAEPEPEAETARGETSRGQYHTLQAGFSSRSQGLSGDKTSGFRPIAKPAYSPASWSSRSV 140
126 DLSCSRRLSSAHNGGSFAFGAAGYGGAQPTPPMPTRPVSFHERGGVGSRADYDTLSLRSRLRPGGLDDRY 195
141 DLSCSRRLSSAHNGGSFAFGAAGYGGAQPTPPMPTRPVSFHERGGVGSRADYDTLSLRSRLRPGGLDDRY 210
196 SLVSEQLEPAATSTYRAFAYERQASSSSSRAGGLDWPEATEVSPSRTIRAPAVRTLQRFQSSHRSGVGG 265
211 SLVSEQLEPAATSTYRAFAYERQASSSSSRAGGLDWPEATEVSPSRTIRAPAVRTLQRFQSSHRSGVGG 280
266 AVPGAVLEPVARAPSVRSLSLADSGHLPDVHGFSNYGSHRTLQRLSSGFDDIDLPSAVKYLMA SDPNL 335
281 AVPGAVLEPVARAPSVRSLSLADSGHLPDVHGFSNYGSHRTLQRLSSGFDDIDLPSAVKYLMA SDPNL 350
336 QVLGAAYIQHKCYSDAAKKQARSLOQAVPRLVKLFNHNANQEVQRHATGAMRNLIYDNADNKLALVEENGI 405
351 QVLGAAYIQHKCYSDAAKKQARSLOQAVPRLVKLFNHNANQEVQRHATGAMRNLIYDNADNKLALVEENGI 420
406 FELLRTLREQDDELKRNVTGILWNLSSSDHLKDRLARDTLEQLDLVLSPLSGAGGPPLIQQNASEEIF 475
421 FELLRTLREQDDELKRNVTGILWNLSSSDHLKDRLARDTLEQLDLVLSPLSGAGGPPLIQQNASEEIF 490
476 YNATGFLRNLSSASQATRQKMRECHGLVDALVTSINHALDAGKCEDKSVENAVCVLRNLSYRLYDEMPPS 545
491 YNATGFLRNLSSASQATRQKMRECHGLVDALVTSINHALDAGKCEDKSVENAVCVLRNLSYRLYDEMPPS 560
546 ALQRLGRGRDLGAGAPPGEVVGCFPTQSRRLRELPLAADALTFAEVSKDPKGLEWLWSPQIVGLYNRL 615
561 ALQRLGRGRDLGAGAPPGEVVGCFPTQSRRLRELPLAADALTFAEVSKDPKGLEWLWSPQIVGLYNRL 630
616 QRCELNRHTTEAAAGALQINITAGDRRWAGVLSRLALEQERILNPLLDVRVTADHHQLRSLTGLIRNLSRN 685
631 QRCELNRHTTEAAAGALQINITAGDRRWAGVLSRLALEQERILNPLLDVRVTADHHQLRSLTGLIRNLSRN 700
686 ARNKDEMS TKVVS H LIEKL GSVGEKSPPAEVLVNI IAVLNNLVVASPIAARDLLYFDGLRKLIFIKKKR 755
701 ARNKDEMS TKVVS H LIEKL GSVGEKSPPAEVLVNI IAVLNNLVVASPIAARDLLYFDGLRKLIFIKKKR 770
756 DSPDSEKSSRAASSLLANLWQYNKLHRDRAKGYRKEDFLGP 797
771 DSPDSEKSSRAASSLLANLWQYNKLHRDRAKGYRKEDFLGP 812

```

Abb. 4-5 Aminosäure-Sequenz von PKP3b im Vergleich zu PKP3a

In der oberen Zeile ist die abgeleitete AS-Sequenz von PKP3a dargestellt. Die untere Reihe zeigt die abgeleitete AS-Sequenz von PKP3b. Identische Aminosäuren sind durch einen vertikalen Strich dargestellt. Abgesehen von den jeweiligen aminoterminalen Enden stimmen die Sequenzen ab Position 12, respektive 28, überein. Rot hinterlegt sind die Positionen der SNPs.

Es ließ sich eine cDNA von PKP3b generieren, die eine Länge von 2505 Nukleotiden aufweist (Abb. 4-4). Im 5'-terminalen Bereich fand sich die 95 Basenpaare lange Sequenz, die sich von der bisher beschriebenen Plakophilin 3-Sequenz unterschied, analog dem EST-Klon DA439471.1. Weiterhin befand sich an Position 1406 ein Basenaustausch (G→A), ebenso an den Positionen 1475 (G→A), 2174 (A→G) und 2411 (T→C), die bekannte SNPs widerspiegelten. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz der generierten cDNA mit der mRNA-Sequenz

von PKP3a (*GeneBank* Zugangs-Nummer NM_007183.2) zeigte, dass es im Bereich dieser Mutationen zu keiner Veränderung des Leserahmens oder einem Abbruch der Sequenz kam (Abb. 4-5).

Die hergestellte cDNA erstreckte sich ab dem 96. Nukleotid entsprechend der Position der dreizehnten Aminosäure über den gesamten kodierenden Bereich des bisher bekannten Plakophilin 3, welcher 2391 Nukleotide umfasste. Somit ließ sich vermuten, dass sich nur der Bereich am amino-terminalen Ende einer möglichen Variante unterscheidet und demzufolge die ersten zwölf Aminosäuren des bekannten PKP3a fehlen.

4.1.3 Erweiterung des 5'-Bereichs der PKP3b-mRNA

Da sich die Sequenz von PKP3b in 3'-Richtung vervollständigen ließ, sollte nun auch in 5'-Richtung der Anfang der mRNA gesucht werden, um eine möglichst vollständige Sequenz der Isoform zu erhalten und mögliche weitere Translationsstartpunkte der mRNA zu identifizieren. Die bisher ermittelten Nukleotide wiesen mit 72,6 % einen relativ hohen GC-Gehalt auf, welcher nach folgender Formel ermittelt wurde:

$$\text{GC-Gehalt [\%]} = (G+C)/(G+C+A+T) \times 100$$

Aufgrund der Tatsache, dass GC-Paarungen drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, können diese, im Gegensatz zu AT-Basenpaarungen mit nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen, zu RNA-Sekundärstrukturen mit einer hohen Stabilität führen (Abb. 4-6). Deshalb wurde in dieser Arbeit eine PCR-basierte Amplifikation von cDNA-Enden (sogenannte RACE) verwendet [86], die speziell darauf zugeschnitten ist, GC-reiche Sequenzen zu amplifizieren.

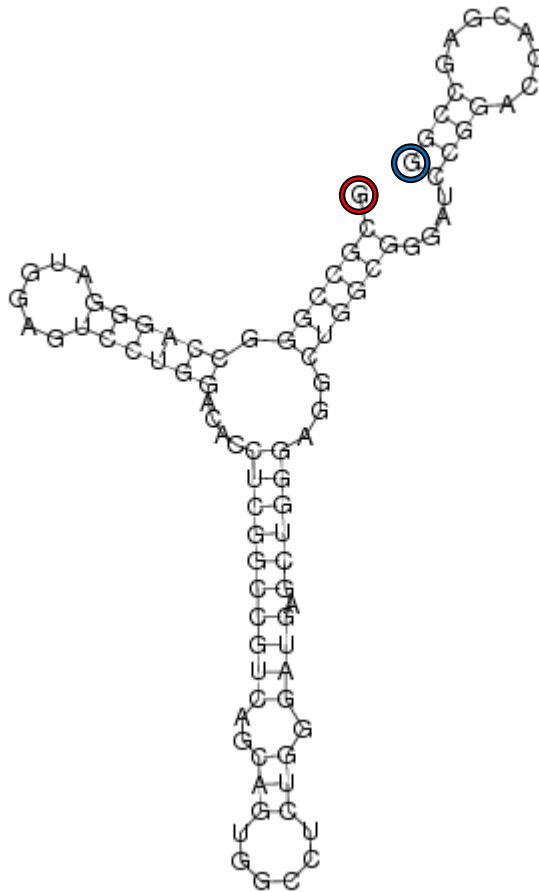


Abb. 4-6 Vorhersage der Sekundärstruktur der ersten 95 Nukleotide von PKP3b [33]

Die Analyse der ersten 95 Nukleotide mit der *Vienna RNA Websuite* zeigt eine mögliche Sekundärstruktur. Diese ist ausgerichtet nach der minimalen freien Enthalpie, die die Struktur einnimmt. Die Abbildung stellt eine von mehreren möglichen Sekundärstrukturen dar. Rot markiert: 1. Nukleotid; blau markiert: 95. Nukleotid.

Dazu wurde die mRNA aus HaCaT-Zellen gewonnen, mittels Thermo-XTM Reverse Transkriptase und einem Gen-spezifischem *antisense-Primer* in cDNA umgeschrieben. An diese einzelsträngige *antisense-cDNA* wurde dann ein doppelsträngiger Adapter (siehe 3.2.5.2) ligiert und in zwei Runden (*Primer*: 1. Runde: PKP3-B inner; 2. Runde: PKP3_Splice_Rv_3103; zusätzlich immer UMPlong) einer sogenannten *nested* PCR eingesetzt. Die erhaltenen Amplikons (Abb. 4-7) der zweiten PCR wurden anschließend in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert, in Bakterien transformiert und einzelne Klone hiervon sequenziert.

Abb. 4-8 zeigt das *Alignment* von einigen der hierbei erhaltenen cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz der Region. Alle sequenzierten cDNAs erbrachten eine unterschiedlich weite Fortführung der im EST-Klon enthaltenen Sequenz 5'-wärts um maximal 18 Nukleotide. Die Sequenzen stimmten, mit Aus-

nahme eines Klons, an ihrem 5'-Ende mit der genomischen Sequenz überein. Klone mit einer längeren Sequenz am 5'-Ende wurden nicht gefunden. (Abb. 4-9).

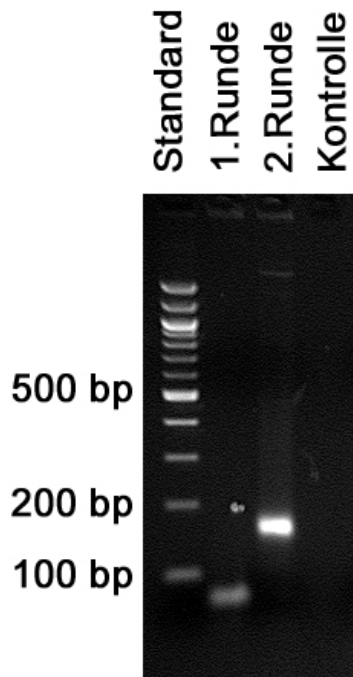


Abb. 4-7 Agarose-Gelelektrophorese der Amplikons der *nested* PCR
Dargestellt ist die elektrophoretische Auftrennung der beiden Runden der *nested* PCR mittels eines 2 %igen Agarose-Gels, zusammen mit einem Größenstandard (100bp-Leiter; NEB). Reihe 1 zeigt das Amplikon der 1. PCR, Reihe 2 das Amplikon der 2. PCR. In Reihe 3 ist die mitgeführte Kontrolle gezeigt (ohne Matrize).

Der Klon DA439471.1 enthielt in den ersten 95 Nukleotiden ein ATG an Position 15, welches als mögliches Startkodon fungieren kann. Bei Betrachtung der genomischen Sequenz weiter aufwärts fielen jedoch weitere potentielle Startkodons auf, welche ebenfalls den Leserahmen fortführen würden und somit möglicherweise den Beginn der Translation von PKP3b darstellen könnten. Sollte dies der Fall sein, so müssten sich cDNAs nachweisen lassen, die diesen Bereich aufwärts mit einschließen.

Weil die RACE-Methode, wie oben gezeigt, nur einen kurzen Sequenzzugewinn erbrachte, wurde versucht, auf anderem Wege durch entsprechende *Primer* mittels RT-PCR Aussagen über weitere 5'-wärts liegende, potentielle Startkodons zu erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus A431-Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und per RETROscript[®] Kit (Ambion) in cDNAs umgeschrieben. Aus dieser cDNA wurde dann mittels PCR (Phusion[™] DNA-Polymerase; New England Biolabs) und spezifischen *Primern* (Tab. 2-1) cDNAs amplifiziert. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass als Vorwärts-*Primer* ein

Sequenzbereich mit dem Beginn des jeweiligen ATGs kombiniert wurde mit den Gegenstrang-*Primern*, die aus der Sequenz stammten, der beiden möglichen Varianten gemeinsam war. Dieser Ansatz erbrachte keine Ergebnisse.

```

Sense Adapter                AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGNNNNN
#2.seq CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG
#3.seq ~TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG
#4.seq CTAA.ACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG
#5.seq CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG
#6.seq CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG

Genom GCAGAGGCTGCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGGACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
#2.seq CC-GAGGCTGCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGGACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
#3.seq CAGAGGCTGCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGAACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
#4.seq GCAGAGGCTGCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGGACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
#5.seq          GCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGGACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
#6.seq GCAGAGGCTGCCCCGCACGCGCCGGGCCAGGGATGGAGTCTTGGACACCTCGGCCGTCAGCAGTGGCC
*****

Genom TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-AT
#2.seq TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-ATCCGGACCACGAGCCGG
#3.seq TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-ATCCGGACCACGAGCCGG
#4.seq TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-ATCCGGACCACGAGCCGG
#5.seq TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-ATCCGGACCACGAGCCGG
#6.seq TCTGGGATGAGCTGGGAGGCTGGCGGG-ATCCGGACCACGAGCCGG
*****

Rev Primer

```

Abb. 4-8 Alignment der cDNA-Sequenzen aus A431-Zellen

Dargestellt sind die von uns erhaltenen Klone in fortlaufender Sequenz (aus Platzgründen in Zeilen getrennt). Nicht farblich hinterlegt ist in der obersten Zeile die Sequenz des *Sense Adapters*, gelb die Sequenz der eingesetzten *nested Primer*. Türkis markiert sind die neuen Sequenzen und grau die bekannte Sequenz. Weiterhin ist in der oberen Reihe die genomische Sequenz dargestellt. ~ und . zeigen mögliche Sequenzier- oder *Primer*-herstellungsfehler; – und die rot markierten Nukleotide könnten durch PCR- oder Sequenzierungsfehler zustande kommen. Die * markieren die Nukleotide, welche in den Sequenzen übereinstimmen.

Gemäß der Promoteranalysen mit einem frei zugänglichen Programm für die Vorhersage von Bindungsstellen potentieller Transkriptionsfaktoren (TFSEARCH; www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) der PKP3b-Variante [106] fanden sich in der Region 103 bp aufwärts des vermuteten Transkriptionsstarts der mRNA konservierte Transkriptionsfaktor-Sequenzen, die auch aktiv zu sein scheinen (Wratten, 2009). Dies machte einen früheren Translationsstart als das von uns vermutete ATG an Position 265 unwahrscheinlich.

```

1  GCAGAGGCTG CCCCACACGC GCCGGGCCAG GGATGGAGTC CTGGACACCT CGGCCGTCAG
61 CAGTGGCCTC TGGGATGAGC TGGGAGGCTG GCGGGATCCG GACCACGAGC CGG

```

Abb. 4-9 RACE-Produkt (#6) vom Kopfteil der PKP3b-mRNA

Es zeigte sich eine Sequenz von 113 Nukleotiden Länge nach Amplifikation von Gesamtzell-mRNA. Die ersten 18 Nukleotide (rot) sind neu hinzugekommen. Das vermutete Startkodon ist blau markiert.

Zusammenfassend gingen wir nach Analyse der bisher erlangten Sequenzen für PKP3b von einer tatsächlich vorhandenen mRNA aus, die für PKP3b kodiert. Die bislang gefundene Nukleotidsequenz ist in Abb. 4-11 dargestellt. Es handelte sich um eine 2523 Nukleotide lange Sequenz. Diese unterschied sich von der bisher bekannten PKP3a-Sequenz durch den Wegfall der ersten 111 Nukleotide durch Anspießen des neu beschriebenen Exons. Dafür waren aber 112 bis dato nicht vorhanden Nukleotide hinzu kommen. Diese befanden sich in der genomischen Sequenz aufwärts der in 4.1.1 erwähnten alternativen Spleißstelle.

```

1  CCAGCCGCAC GGAAGCCCCT TCACTGAGTC CTCTTGTGAG CCCTTCGGCC TGA CTGGGCT
61 GCAGAGGCCC TCCAGGCTGG CTTCCCCCTC ATGCCGCCCA GCCTGGCCCC TGCAGGGCCC
121 CAGGTGGGCC TGGGGTGGAC CTGGGTGCAG GCGGGGACCC AGCCCATGCC AGGCACATAC
181 CTCCAGGCCC GCTCTGCGCC GCACAAACTT GTCTCCAGG ATT TTTCCAC ACGAA ACCTG
241 TCTCCAGGG AATCAGCCAG TCCGATGAGC TGGGCGTTCC CACCCCGCCC TCCGAGGCCC
301 CCACAGTCCT GTCCCCGCC CAGAGGCTGC CCCGCACGCG CCGGGCCAGG GATGGAGTCC
361 TGGACACCTC GGCCGTCAGC AGTGGCCTCT GGGATGAGCT

```

Abb. 4-10 Ausschnitt aus dem genomischen Bereich vor dem Exon -1

Darstellung der genomischen Sequenz auf Chromosom 11p15 stromaufwärts des vermuteten ATGs (blau). Weitere mögliche Startkodons sind rot stromaufwärts markiert. Grün hinterlegt ist der mögliche Transkriptionsstart der mRNA nach unseren Ergebnissen, gelb hinterlegt die potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP [106].

Verglich man die Eigenschaften der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Proteine von PKP3a und PKP3b, ergab sich für PKP3b ein isoelektrischer Punkt von $pI = 9,48$ im Gegensatz zu PKP3a, welches seinen pI bei $pH\ 9.38$ hat. Das Molekulargewicht der neuen Variante lag mit $88.655\ Da$ ca. $1.600\ Da$ über dem von PKP3a ($87.081\ Da$). Dieses deckte sich mit der anfangs erwähnten Proteinbande im SDS-PAGE (siehe 4.1). Die Angaben für PKP3b wurden vorhergesagt mit Hilfe der frei zugänglichen *ExPASy-Tools*-Programme (http://expasy.org/cgi-bin/pi_tool).

```

1  GCAGAGGCTG CCCCACACGC GCCGGGCCAG GGATGGAGTC CTGGACACCT
51  CGGCCGTCAG CAGTGGCCTC TGGGATGAGC TGGGAGGCTG GCGGGATCCG
101 GACCACGAGC CGGCCTGAGG CCGGCGTGTG CTCCCTGGCG CTGCCCTCTG
151 ACCTGCAGCT GGACCGCCGG GCGGCCGAGG GGCCGGAGGC CGAGCGGCTG
201 CGGGCAGCCC GCGTCCAGGA GCAGGTCCGC GCCC GCCTCT TGCAGCTGGG
251 ACAGCAGCCG CGGCACAACG GGGCCGCTGA GCCC GAGCCT GAGGCCGAGA
301 CTGCCAGAGG CACATCCAGG GGGCAGTACC ACACCC TGCA GGCTGGCTTC
351 AGCTCTCGCT CTCAGGCCTT GAGTGGGGAC AAGACCTCGG GCTTCCGGCC
401 CATCGCCAAG CCGGCCTACA GCCCAGCCTC CTGGTCTTCC CGCTCCGCCG
451 TGGATCTGAG CTGCAGTCGG AGGCTGAGTT CAGCCCACAA TGGGGGCAGC
501 GCCTTTGGGG CCGCTGGGTA CGGGGTGACC CAGCCCACCC CTCCCATGCC
551 CACCAGGCCC GTGTCTTCC ATGAGCGCGG TGGGGTTGGG AGCCGGGCCG
601 ACTATGACAC ACTCTCCCTG CGCTCGCTGC GGCTGGGGCC CGGGGGCCTG
651 GACGACCGCT ACAGCCTGGT GTCTGAGCAG CTGGAGCCCG CCGCCACCTC
701 CACCTACAGG GCCTTTGCGT ACGAGCGCCA GGCCAGCTCC AGCTCCAGCC
751 GGGCAGGGGG GCTGGACTGG CCCGAGGCCA CTGAGGTTTC CCCGAGCCGG
801 ACCATCCGTG CCCCTGCCGT GCGGACCCTG CAGCGATTCC AGAGCAGCCA
851 CCGGAGCCGC GGGGTAGGCG GGGCAGTGCC GGGGGCCGTC CTGGAGCCAG
901 TGGCTCGAGC GCCATCTGTG CGCAGCCTCA GCCTCAGCCT GGCTGACTCG
951 GGCCACCTGC CGGACGTGCA TGGGTTC AAC AGCTACGGTA GCCACCGAAC
1001 CCTGCAGAGA CTCAGCAGCG GTTTTGATGA CATTGACCTG CCCTCAGCAG
1051 TCAAGTACCT CATGGCTTCA GACCCCAACC TGCAGGTGCT GGGAGCGGCC
1101 TACATCCAGC ACAAGTGCTA CAGCGATGCA GCCGCCAAGA AGCAGGCCCG
1151 CAGCCTTCAG GCCGTGCCTA GGCTGGTGAA GCTCTTCAAC CACGCCAACCC
1201 AGGAAGTGCA GCGCCATGCC ACAGGTGCCA TGCGCAACCT CATCTACGAC
1251 AACGCTGACA ACAAGCTGGC CCTGGTGGAG GAGAACGGGA TCTTCGAGCT
1301 GCTGCGGACA CTGCGGGAGC AGGATGATGA GCTTCGCAAA AATGTCACAG
1351 GGATCCTGTG GAACCTTTC TCCAGCGACC ACCTGAAGGA CCGCTGGGCC
1401 AGAGACACGC TGGAGCAGCT CACAGACCTG GTGTTGAGCC CCCTGTCGGG
1451 GGCTGGGGGT CCCCCCTCA TCCAGCAGAA CGCCTCGGAG GCAGAGATCT
1501 TCTACAACGC CACCGGCTTC CTCAGGAACC TCAGCTCAGC CTCTCAGGCC
1551 ACTCGCCAGA AGATGCGGGA GTGCCACGGG CTGGTGGACG CCCTGGTCAC
1601 CTCTATCAAC CACGCCCTGG ACGCGGGCAA ATGCGAGGAC AAGAGCGTGG
1651 AGAACGCGGT GTGCGTCCTG CGGAACCTGT CCTACCGCCT CTACGACGAG
1701 ATGCCGCGGT CCGCGCTGCA GCGGCTGGAG GGTGCGGGCC GCAGGGACCT
1751 GCGGGGGGCG CCGCCGGGAG AGGTCGTGGG CTGCTTCACG CCGCAGAGCC
1801 GCGGGCTGCG CGAGCTGCCC CTCGCCGCCG ATGCGCTCAC CTTGCGGGAG
1851 GTGTCCAAGG ACCCAAGGG CCTCGAGTGG CTGTGGAGCC CCCAGATCGT
1901 GGGGCTGTAC AACCGGCTGC TGCAGCGCTG CGAGCTCAAC CGGCACACGA
1951 CGGAGGCGGC CGCCGGGGCG CTGCAGAACA TCACGGCAGG CGACCGCAGG
2001 TGGGCGGGGG TGCTGAGCCG CCTGGCCCTG GAGCAGGAGC GTATTCTGAA
2051 CCCCCTGCTA GACCGTGTCA GGACCGCCGA CCACCACCAG CTGCGCTCAC
2101 TGA CTGGCCT CATCCGAAAC CTGTCTCGGA ACGCTAGGAA CAAGGACGAG
2151 ATGTCCACGA AGGTGGTGAG CCACCTGATC GAGAAGCTGC CGGGCAGCGT
2201 GGGTGAGAAG TCGCCCCCAG CCGAGGTGCT GGTCAACATC ATAGCTGTGC
2251 TCAACACCTT GGTGGTGGCC AGCCCCATCG CTGCCCGAGA CCTGTGTAT
2301 TTTGACGGAC TCCGAAAGCT CATCTTCATC AAGAAGAAGC GGGACAGCCC
2351 CGACAGTGAG AAGTCCTCC CAGGAGCATC CAGCCTCCTG GCCAACCTGT
2401 GGCAGTACAA CAAGCTCCAC CGTGACTTCC GGGCGAAGGG CTATCGGAAG
2451 GAGGACTTCC TGGGCCCCA TAGTGAAGCCT TCTGGAGGAG AAGGTGACGT
2501 GGCCAGCGT CCAAGGGACA GAC

```

Abb. 4-11 Ermittelte cDNA-Sequenz von PKP3b

Die Abbildung zeigt die bekannte 2523 Nukleotid lange Sequenz von PKP3b, welche von einer mRNA abgeleitet ist. Die ersten 112 Nukleotide (rot markiert) unterschieden sich von der bisher bekannten Basenabfolge des PKP3a. Blau sind das vermutete Startkodon (ATG) und das Stoppkodon (TAG) markiert.

4.2 Proteinexpressionsanalysen der Variante PKP3b

Da die Variante PKP3b vermutlich durch eine eigene mRNA repräsentiert ist, sollte nun geklärt werden, ob diese auch als Teil des Proteins translatiert wird. Deshalb wurden polyklonale Antikörper-Seren generiert, welche Epitope erkennen, die spezifisch nur in der neuen, noch nicht beschriebenen Variante PKP3b, bzw. nur in dem ursprünglichen PKP3a vorhanden sind. Diese polyklonalen Antiseren, die wie unter 3.3.2 beschrieben aus Kaninchen gewonnen wurden, wurden eingesetzt, um PKP3b immunbiochemisch und -zytologisch in diversen Zelllinien nachzuweisen.

4.2.1 Herstellung des cDNA-Klons von PKP3b für die stabile Transfektion von PLC-Zellen.

Um die Spezifität der polyklonalen Antiseren zu testen, wurden cDNAs von PKP3a und PKP3b in PLC-Zellen transfiziert (siehe 3.2.9). Dazu musste zuerst die vollständige cDNA von PKP3b hergestellt werden. Die vollständige cDNA von PKP3a (im eukaryontischen Expressions-Vektor pcDNA6-His-A; Invitrogen) stand bereits zur Verfügung.

Um nun eine möglichst vollständige, fehlerfreie cDNA der Variante PKP3b zu erstellen, wurde die cDNA des unter 4.1.2 generierten 1,8 kb-Fragments genutzt. An diese sollte die fehlende 3'-Sequenz aus der cDNA von PKP3a angefügt werden. Die komplettierte cDNA der Variante PKP3b sollte schließlich in den pcDNA6-Vektor eingebracht werden.

Dazu wurde die cDNA des 1,8 kb-Fragmentes von PKP3b aus dem pGEM T-Easy Vektor in ein Derivat des pBlueskriptII-Vektors (pBskR3; A. Schmidt persönliche Mitteilung) umkloniert, indem sie aus dem pGEM T-Easy Vektor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* isoliert wurde und in den ebenfalls mit *EcoRI* restringierten und mit SAP dephosphorylierten pBskR3-Vektor ligiert wurde. Der Transfer in den Vektor pBskR3 wurde durchgeführt, um eine passende Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende der cDNA zu erhalten, die für die Umklonierung in den pcDNA-6-His-A-Vektor benötigt wurde. Mit dem Ligationsprodukt wurden *E. coli* Bakterien vom Stamm JM109 transformiert und Plasmide isoliert, die das *Insert* enthielten.

Anschließend wurde aus dem so erhaltenen Plasmid durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *KpnI* und *BsiWI* ein 753 bp großes Fragment herausgeschnitten, wobei die Schnittstelle für *KpnI* aus der *multiple cloning site* des pBskR3-Vektors stammt, und die *BsiWI*-Schnittstelle innerhalb der cDNA Sequenz lag. Durch einen entsprechenden Restriktionsverdau wurde aus dem pcDNA6-Vektor, der die cDNA der Variante PKP3a beinhaltetete, das 5'-Ende der cDNA entfernt. In diesen geöffneten pcDNA6-Vektor wurde das aufgereinigte *KpnI*-*BsiWI*-Fragment aus der cDNA von PKP3b ligiert. Mit dem Konstrukt, welches den kompletten kodierenden Bereich von der Variante PKP3b beinhaltetete, wurden XL-1 Blue Bakterien transformiert und aus diesen die Plasmide isoliert, die den entsprechenden Sequenzaustausch aufwiesen.

PKP3b 1,8kb-Fragment

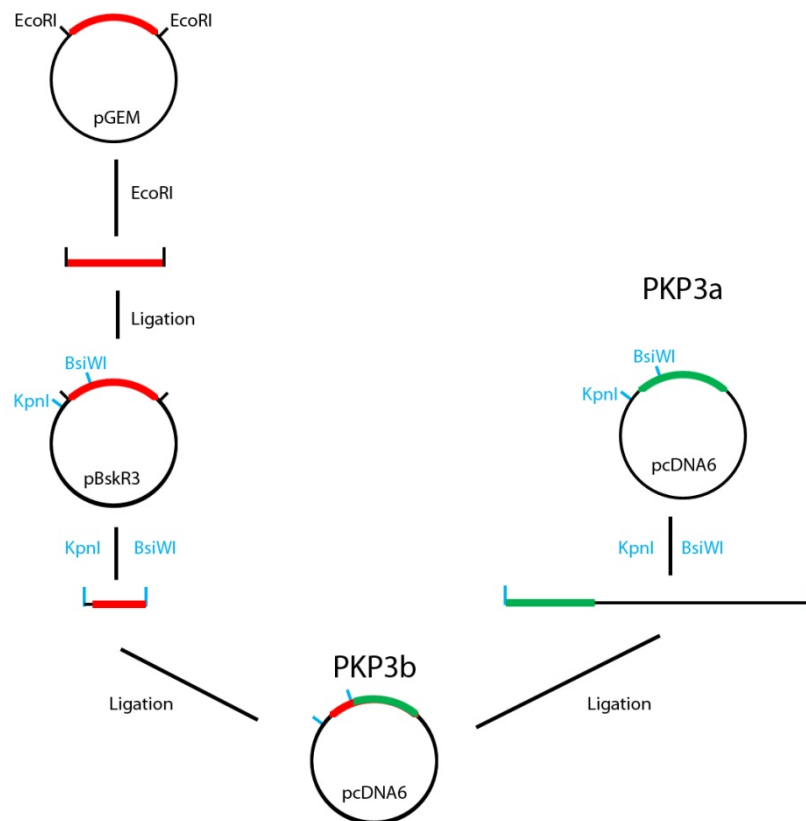


Abb. 4-12 Schematische Darstellung der Konstruktion von PKP3b für die stabile Transfektion

Links das 1,8kb-Fragment von PKP3b, welches aus dem pGEM-Vektor in den pBskR3-Vektor umkloniert wurde, um die passende Schnittstelle für die weitere Umklonierung in den pcDNA6-Vektor zu erhalten. Rechts das bereits im pcDNA6-Vektor vorliegende PKP3a. Durch Restriktionsschnittstellenwahl (Mitte) konnte das komplettierte PKP3b erzeugt werden.

Als durch Sequenzierung des Konstrukts (Andreas Hunziker, Heidelberg) sichergestellt worden war, dass die Sequenz wie gewünscht vorlag, wurde mit der Transfektion des Plasmidkonstrukts in PLC-Zellen fortgefahren.

4.2.2 Herstellung von polyklonalen Antiseren für PKP3a und b

Um polyklonale Antiseren für beide Varianten herzustellen, wurden spezifische Aminosäure-Sequenzen als Epitope benötigt, die jeweils nur in einer der beiden Plakophilin-Versionen vorkommen. Dazu boten sich die Exons 1 (PKP3a) und -1 (PKP3b) und deren translatierte unterschiedliche AS-Abfolge im N-terminalen Bereich an (Abb. 4-5). Für PKP3a wurde folgendes Oligopeptid synthetisiert:

MQDGNFLLSALQ^C

Für PKP3b wurde folgende Sequenz zur Grundlage:

MESWTPRPSAVASG^C

Die Analyse der beiden Peptidsequenzen in Sequenzdatenbanken mittels BLASTP (www.ncbi.nlm.nih.gov) erbrachte für das PKP3a-Peptid die entsprechenden Ergebnisse für PKP3, während sich die Aminosäure-Sequenz der neuen PKP3b-Variante mit keiner bekannten Sequenzen aus höheren Eukaryonten deckte. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen des Wirts kommen konnte. Beide Oligopeptide wiesen auch nach Analyse mit entsprechenden Vorhersageprogrammen eine ausreichende Antigenität auf. Um die Peptide dem Immunsystem des Versuchstiers zugänglich zu machen, wurden sie mittels der Sulfhydryl-Gruppe des artifiziell am Carboxyl-Terminus hinzugefügten Cystein-Restes (rot markiert) an aktiviertes Hämocyanin aus Schnecken (*keyhole-limpet hemocyanine*; KLH) kovalent gekoppelt. Hergestellt und bezogen wurden die verwendeten Peptide von der Firma PSL, Heidelberg.

Um nun damit Antiseren zu gewinnen, wurden je zwei männliche Kaninchen (Stamm *New Zealand White*; Charles-River Wega), wie unter 3.3.2 beschrieben, immunisiert und entblutet. Aus dem geronnenen Blut wurde das Serum isoliert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Erhöhung der Spezifität der Antiseren wurden die spezifischen Antikörper gegen PKP3a bzw. PKP3b immunaffinitätsgereinigt. Dazu wurden die zur Immunisierung verwendeten Peptide an eine Säulenmatrix über die Sulfhydryl-Gruppe gekoppelt (Micro Peptide

Coupling Kit, Pierce). Die Antigen-gekoppelten Säulen wurden nach Herstellerangaben zur Aufreinigung der spezifischen Antikörper aus den Seren genutzt. Nach Aufreinigung und Elution der Antiseren konnten diese dann einer Spezifitätskontrolle zugeführt werden.

Um die Spezifität der polyklonalen Antiseren für die entsprechenden Epitope zu überprüfen, wurden native PLC-Zellen mit der cDNA von PKP3a bzw. PKP3b, kloniert in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6-His-A (Invitrogen), stabil transfiziert (siehe 3.2.9). Native PLC-Zellen, welche aus einem humanem Leberzellkarzinom abstammen, exprimieren endogen weder Plakophilin 3a noch 3b, so dass deren Transfektion mit jeweils einer der beiden Varianten als Spezifitätstest für die Antiseren nutzbar war.

Anschließend wurde Gesamtzell-Protein aus nativen sowie den jeweils stabil transfizierten PLC-Zellen aufgereinigt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran und Hybridisierung mit den jeweiligen Antiseren und dem mAk PKP3-310.9.1 wurde das Chemolumineszenz-Signal detektiert (Abb. 4-13; die ersten drei Spuren, jeweils von A-C).

Es konnte gezeigt werden, dass in nativen PLC-Zellen weder Plakophilin 3a noch 3b vom monoklonalen Antikörper PKP3-310.9.1 oder einem der beiden Antiseren detektiert werden konnte. In mit PKP3a stabil transfizierten PLC-Zellen wurde sowohl mit dem monoklonalen Antikörper als auch mit dem polyklonalen Antiserum ein spezifisches Signal für PKP3a detektiert. Das Antiserum für PKP3b erbrachte dagegen keinen spezifischen Nachweis. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den mit PKP3b stabil transfizierten PLC-Zellen eine positive Reaktion mit PKP3-310.9.1 und dem Antiserum gegen PKP3b, während PKP3a nicht nachgewiesen werden konnte.

Die aufgereinigten Varianten-spezifischen Antikörper reagierten also im immunbiochemischen Nachweis spezifisch mit ihren Antigenen.

4.2.3 Western Blot-Analysen der Plakophilin-Varianten PKP3a und 3b

Verschiedene Zelllinien wurden auf die Expression von PKP3a und PKP3b analysiert. Dazu wurden die unter 4.2.2 hergestellten polyklonalen Antiseren, welche jeweils Epitope einer der beiden Varianten erkennen, genutzt. Analysiert wurde in

dieser Arbeit das Expressionsverhalten der humanen Zelllinien A431, HaCaT und CaCo-2. Die Zelllinie A431 leitet sich aus einem Vulva-Karzinom ab, HaCaT-Zellen stammen von spontan immortalisierten Hautkeratinozyten ab [12]. Beide repräsentierten damit mehrschichtige Epithelien. Dagegen entstammen CaCo-2-Zellen einem Colon-Karzinom und sind ihrem Ursprung nach einschichtiges Epithel.

Für *Western Blot*-Analysen wurde aus allen Zellen das Gesamtproteom isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen mit den polyklonalen Antiseren gegen PKP3a und PKP3b inkubiert und ausgewertet. Als Kontrolle für den Nachweis beider Varianten von PKP3 (a oder b) wurde der monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 verwendet, dessen Epitop in einem Bereich des Proteins liegt, welcher beiden Varianten gemeinsam ist [82].

Wie in Abb. 4-13 A dargestellt, erkannte der monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 Proteine in allen drei Zelllinien (A431, HaCaT und CaCo-2).

Bei Inkubation der Membran mit dem polyklonalen Antiserum für PKP3a (Abb.4-13 B) zeigte sich ebenfalls eine spezifische Reaktion für alle drei Zelllinien, jedoch deuten die schmalere Signale möglicherweise auf eine geringere Proteinexpressionsrate hin. Mit dem Antiserum für PKP3b konnte sowohl in der HaCaT-Zelllinie als auch in der A431-Zelllinie eine Reaktion detektiert werden (Abb. 4-13 C), auch hier erschienen die Banden für HaCaT und A431 schmaler als in Abb. 4-13 A. Dagegen blieb im Proteinextrakt von CaCo-2 mit dem spezifischen Antiserum für PKP3b ein Signalnachweis aus. Die zusätzlich sichtbaren Bande bei den HaCaT-Zellen (Pfeil), aber auch bei den anderen Zelllinien, stellte vermutlich ein Degradationsprodukt von Plakophilin 3 dar.

Somit konnte gezeigt werden, dass die alternative Spleißvariante selektiv in mehrschichtigen Epithelien wie den HaCaT- oder A341-Zellen exprimiert wurde, während Zellen der Linie CaCo-2, die dem einschichtigen Epitheltyp (Zylinderepitheltyp) entsprachen, diese Isoform nicht exprimierten.

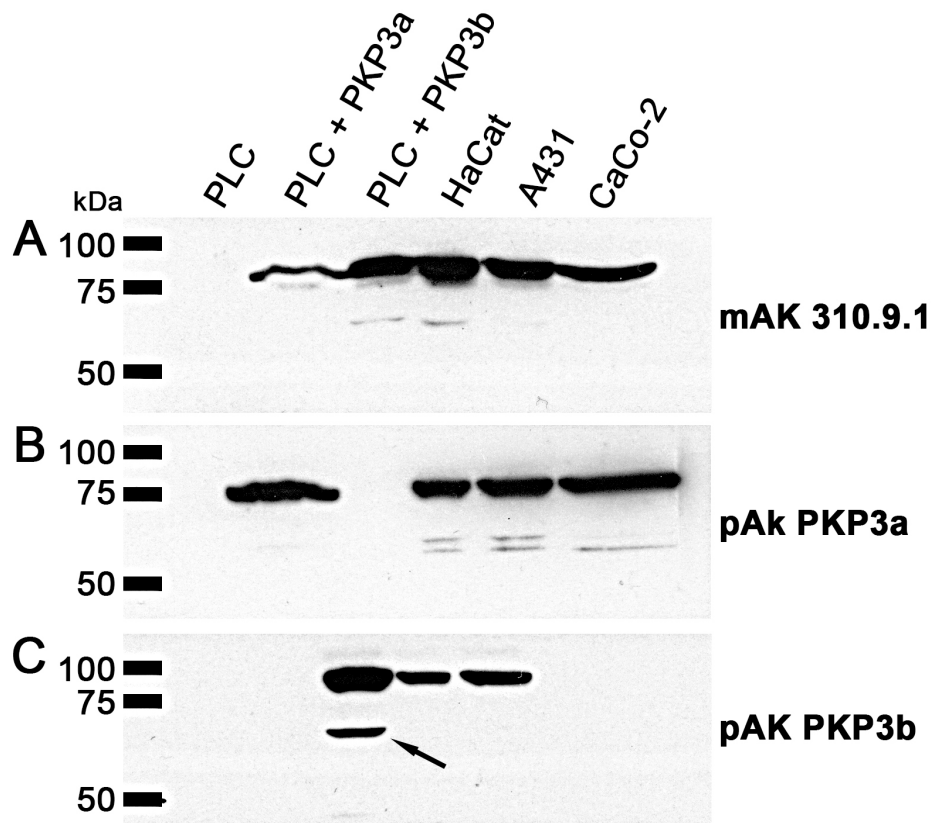


Abb. 4-13 Western Blot-Analysen der Plakophilin-Varianten

(A) zeigt den immunbiochemischen Nachweis von PKP3 in Gesamtzell-Protein sowohl der nativen und stabil transfizierten (+PKP3a; +PKP3b) PLC-Zellen als auch der HaCaT-, A431- und CaCo-2-Zellen mit dem monoklonalen Ak PKP3-310.9.1. Außer in der Linie PLC erkannte der Antikörper ein Protein mit einer Größe von etwa 83kDa. (B) zeigt den immunbiochemischen Nachweis von PKP3a im Gesamtprotein der gleichen Zelltypen mit dem polyklonalen Serum für PKP3a. Hier fanden sich positive Signale in allen Zelllinien außer den nativen und stabil mit PKP3b transfizierten Zellen. (C) wurde mit dem polyklonalen Antiserum gegen PKP3b inkubiert. Hier zeigte sich lediglich ein Signal bei den mit PKP3b stabil transfizierten PLC-Zellen, sowie HaCaT und A-431 Zellen. CaCo-2-Zellen zeigten keine Reaktion. Der Pfeil weist auf eine zusätzliche Bande hin, die möglicherweise ein Degradationsprodukt darstellt. Linker Rand: Proteinstandard in kDa.

4.2.4 Immunfluoreszenzanalysen der Plakophilin 3-Varianten a / b

Zusätzlich zu den oben durchgeführten *Western Blot*-Analysen (4.2.3) sollte das Expressionsverhalten von PKP3a und PKP3b in Zellen untersucht werden und ein Überblick über die Lokalisation des PKP3b gewonnen werden.

4.2.4.1 Spezifität der polyklonalen Antiseren in der Immunfluoreszenz

Zuerst wurden wie unter 3.1 und 3.5 beschrieben, native PLC-Zellen und die stabil mit PKP3a oder PKP3b transfizierten PLC-Zellen angezüchtet, fixiert, mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert und anschließend mit einem Fluores-

zenz-markierten Sekundärantikörper (Cy3 für die polyklonalen Seren, Cy2 für den monoklonalen Ak PKP3-310.9.1) behandelt.

Zusätzlich wurde immer eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Zur Auswertung der Färbungen wurde ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss) verwendet.

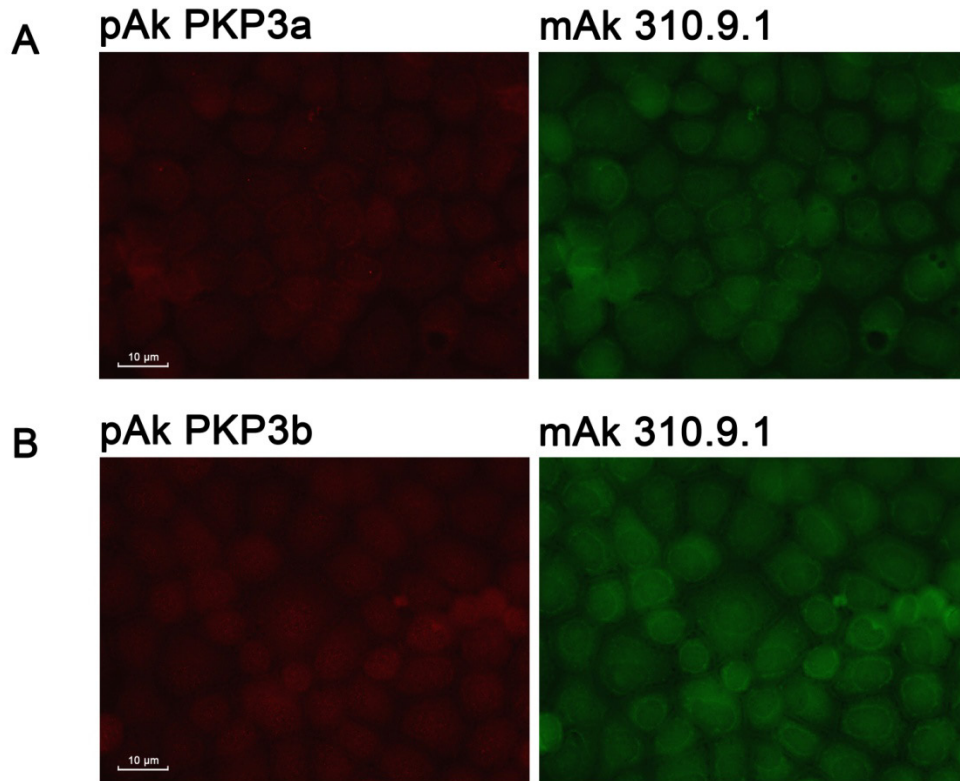


Abb. 4-14 Native PLC-Zellen, inkubiert mit den jeweiligen polyklonalen Antiseren.

In der oberen Reihe (A) sind native PLC-Zellen abgebildet, welche mit dem Serum für PKP3a (rot; 1:500) und dem mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) koinkubiert wurden. Die untere Reihe (B) stellt die Koinkubation von pAk PKP3b (rot; 1:500) und mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) dar. Außer einer Hintergrundfärbung waren keine spezifischen Reaktionen erkennbar.

Die Anfärbung der nativen PLC-Zellen zeigte für die Antiseren gegen PKP3a (Abb. 4-14 A) oder PKP3b (Abb. 4-14 B) wie erwartet kein spezifisches Signal. Der in einer Doppelmarkierung parallel eingesetzte monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 war ebenfalls negativ (Abb. 4-14).

Dagegen ließ sich das Plakophilin 3a mit dem pAk PKP3a in den mit der cDNA von Plakophilin 3a stabil-transfizierten PLC-Zellen nachweisen (Abb. 4-15).

Das Plakophilin 3a lokalisierte in dem Bereich der Zellgrenzen, was einer Desmosomen-typischen Lokalisation entsprach. Der monoklonale Antikörper als Kontrolle färbte dieselben Strukturen an. Dies wurde durch Überlagerung beider Fluoreszenzbilder bestimmt.

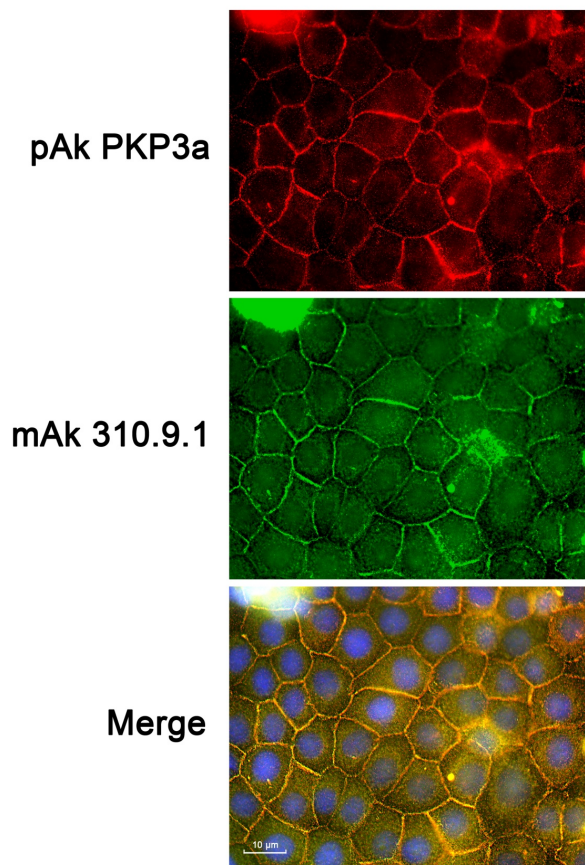


Abb. 4-15 Immunfluoreszenzfarbgebung von PKP3a in stabil transfizierten PLC Zellen

PLC-Zellen wurden stabil mit der cDNA von PKP3a transfiziert, angezüchtet und der Analyse zugeführt. Dargestellt ist die Detektion mit pAk PKP3a (rot; 1:500), die Koinkubation mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und die Überlagerung beider Färbungen (unten). Zusätzlich ist unten die DAPI-Kernfärbung sichtbar. Sowohl das Antiserum gegen PKP3a und der monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 markierten dieselben Strukturen an den Zellgrenzen, die einer desmosomalen Färbung entsprechen. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld abgebildet.

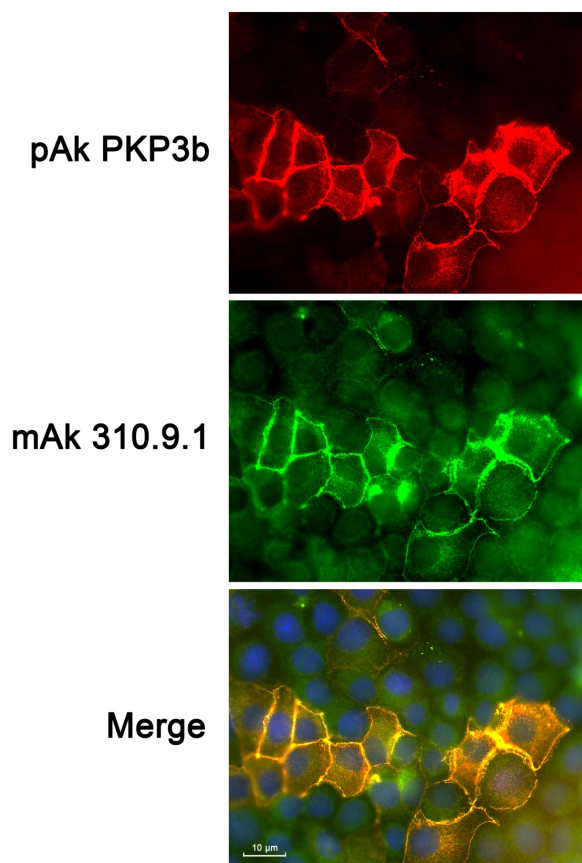


Abb. 4-16 Immunfluoreszenzfarbgebung von PKP3b in stabil transfizierten PLC-Zellen

PLC-Zellen wurden stabil mit der cDNA von PKP3b transfiziert (der Anteil der transfizierten Zellen lag bei etwa 30 %), angezüchtet und der Analyse zugeführt. Dargestellt ist die Detektion mit pAk PKP3b (rot; 1:500), die Koinkubation mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und die Überlagerung beider Färbungen (unten). Auch hier wird PKP3b an den Zellgrenzen gefunden, was den Desmosomen entsprechen sollte. Zusätzlich ist unten die DAPI-Kernfärbung sichtbar. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld abgebildet.

Ein entsprechendes Ergebnis ließ sich auch für die Antikörper gegen die Isoform PKP3b erzielen, wenn diese auf den stabil mit der cDNA für PKP3b transfizierten PLC-Zellen eingesetzt wurden (Abb. 4-16). Auch hier war ein Signal mit dem Antiserum im Bereich der klassischen desmosomalen Strukturen nachweisbar, ebenso wie bei Färbung mit mAk PKP3-310.9.1. Es konnten gleiche Strukturen in Einzelfärbungen mit den jeweiligen Antiseren detektiert werden. Somit erwiesen sich die Antiseren für die Immunfluoreszenzanalyse als spezifisch, die beiden Plakophilin-Varianten zu detektieren. Die folgenden Analysen wurden demnach mit diesen Antiseren durchgeführt.

4.2.4.2 Expressionsnachweis von PKP3b in verschiedenen Zelllinien

Nachdem die polyklonalen Antikörper gegen Plakophilin 3a und 3b von uns als spezifisches Nachweisreagenz erachtet wurden, um die jeweiligen Varianten zu detektieren, sollten verschiedene Zelllinien auf deren Expressions- und Lokalisationsmuster von PKP3b untersucht werden.

Dazu wurden wie unter 3.1 und 3.5 beschrieben HaCaT-, A431- und auch CaCo-2-Zellen angezüchtet und fixiert, um mit dem jeweiligen Primärantikörper (pAk PKP3a und b, in Doppellokalisierung zusätzlich mit mAk PKP3-310.9.1), gefolgt vom fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Cy3 für die polyklonalen Seren, Cy2 für den monoklonalen Ak PKP3-310.9.1), behandelt zu werden. Zusätzlich wurde immer eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt.

Die Anfärbung der HaCaT-Zellen mit dem polyklonalen Antiserum gegen PKP3a zeigte eine Lokalisation im Bereich der Zellmembranen (Abb. 4-17 A). An dieser Stelle in den Zellen konnte auch der monoklonale Ak PKP3-310.9.1 binden, welcher spezifisch für ein Epitop ist, das in beiden PKP3-Varianten vorkommt. Wurden beide Fluoreszenzbilder elektronisch überlagert, zeigte sich eine Kolo-kalisation beider Antikörperreaktionen.

Auch das polyklonale Antiserum gegen PKP3b erbrachte eine typische desmosomale Lokalisation in der Keratinozytenzelllinie HaCaT. Es wurden bei Doppelmarkierung mit dem mAk PKP3-310.9.1 dieselben Strukturen angefärbt (Abb. 4-17 B). Die elektronische Überlagerung beider Fluoreszenzen zeigte auch hier eine komplette Entsprechung der Markierungen. Beide Varianten wurden

demnach in HaCaT exprimiert und lokalisierten in gleichem Ausmaß in den Desmosomen.

Auch bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen mit höherer Auflösung (100x) konnte in desmosomalen Strukturen kein Bereich gefunden werden, der bei Überlagerung beider Fluoreszenzen lediglich die grüne Markierung aufwies. Dies deutete darauf hin, dass in desmosomalen Zellverbindungen beide Varianten integriert wurden und die Variante PKP3a, die sich in diesem Fall durch das Auftreten lediglich der grün markierten Fluoreszenz zeigen sollte, nicht solitär zur Darstellung kam.

Um die Lokalisation der Isoform PKP3b in A431-Zellen zu untersuchen, wurde die humane epidermoide Karzinomzelllinie mit den polyklonalen Antikörper für beide Varianten inkubiert. Es zeigte sich sowohl für die bekannte Variante PKP3a als auch für die neue Variante PKP3b eine Markierung durch die Antikörper an Strukturen im Bereich der Zellmembran, welche den Desmosomen entsprachen (Abb. 4-18 A und B). Auch die Doppelfärbung mit dem mAk PKP3-310.9.1 brachte dasselbe Ergebnis hervor, welches durch die elektronische Überlagerung der Aufnahmen bestätigt wurde. Es schienen auch in diesem Zelltyp beide Varianten vorzukommen und in die Desmosomen zu integrieren.

Als weiterer Zelltyp wurde die humane Colonkarzinom-Zelllinie CaCo-2 untersucht. Diese aus einschichtigem Epithel hervorgegangene Zelllinie wurde wie oben beschrieben mit beiden polyklonalen Antiseren gegen PKP3a und b und zusätzlich mit dem mAk PKP3-310.9.1 inkubiert und analysiert. Die bekannte Variante PKP3a zeigte die erwartete Markierung im Bereich der Zellgrenzen (Abb.4-19 A) in einem Desmosomen-typischem Erscheinungsbild. Auch die Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper konnte eine Reaktion an diesen Orten hervorrufen. Die elektronische Überlagerung beider Bilder zeigt die Kolo-kalisation beider Antikörper.

Im Gegensatz dazu ließ sich die alternative Variante PKP3b in diesen Zellen immunzytologisch, abgesehen von einer leichten Hintergrundfärbung, nicht nachweisen (Abb. 4-19 B).

Die Färbung mit dem mAk PKP3-310.9.1 erbrachte hingegen eine deutliche Anfärbung der Desmosomen (vergleiche Abb. 4-19 A). In CaCo-2-Zellen wurde damit folglich ausschließlich PKP3a und nicht PKP3b exprimiert. Damit deckten

sich die Ergebnisse mit den immunbiochemischen Analysen. Die alleinige Bindung von mAk PKP3-310.9.1 stellte sich ebenfalls bei Überlagerung der Bilder dar.

Somit konnte gezeigt werden, dass PKP3a in allen drei analysierten Zelllinien exprimiert und in Desmosomen-typischer Lokalisation akkumuliert, während die Variante PKP3b in Zellen aus mehrschichtigen (inklusive tumorös veränderten) Epithelien exprimiert wurde und hier ebenfalls in desmosomal ähnlichen Strukturen lokalisiert. Dagegen wurde sie in der tumorös veränderten Zelllinie CaCo-2, die sich aus einem einschichtigen Epithel ableitete, nicht gebildet.

Um zu überprüfen, ob PKP3b generell in einschichtigen Epithelien und Zellen, die sich daraus ableiten, nicht gebildet wird, wurden zusätzlich die Tumorzelllinien HT-29 (Colonkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom) und A549 (Alveolarzellkarzinom), welche alle drei aus einschichtigen Epithelien bzw. Zylinderepithelien abgeleitet sind, untersucht.

Die HT-29-Zelllinie zeigte bei Inkubation mit dem polyklonalen Antiserum für PKP3b ein lokal begrenztes, punktförmiges Signal an den Zellgrenzen, ohne dass alle Desmosomen gefärbt wurden. Dies zeigte der entsprechende Vergleich mit dem monoklonalen Antikörper PKP3-310.9.1, der die gesamte Zellgrenze markiert (Abb. 4-20 A) hatte.

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigte ebenfalls positive Signale für Plakophilin 3b. Aber auch hier war die Färbung heterogen, sodass ca. 70 % der Zellen negativ waren und 30 % eine desmosomale Reaktion zeigten. Der mAk PKP3-310.9.1 färbte auch hier wieder die gesamten desmosomalen Zellverbindungen (Abb. 4-20 B).

Die Zelllinie A549 erbrachte keine Fluoreszenzmarkierung für die Variante PKP3b und nur reduzierte, jedoch deutlich positive Fluoreszenz für den monoklonalen Antikörper (Abb. 4-20 C). Auch in diesem Fall färbte der monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 die desmosomalen Strukturen, die in dieser Zelllinie nicht sehr markant ausgeprägt waren.

Die Färbungen mit spezifischen Antikörpern für PKP3a entsprachen in der Doppellokalisierung bei allen drei Zelllinien komplett der Färbung mit dem monoklonalen Antikörper PKP3-310.9.1 (nicht gezeigt).

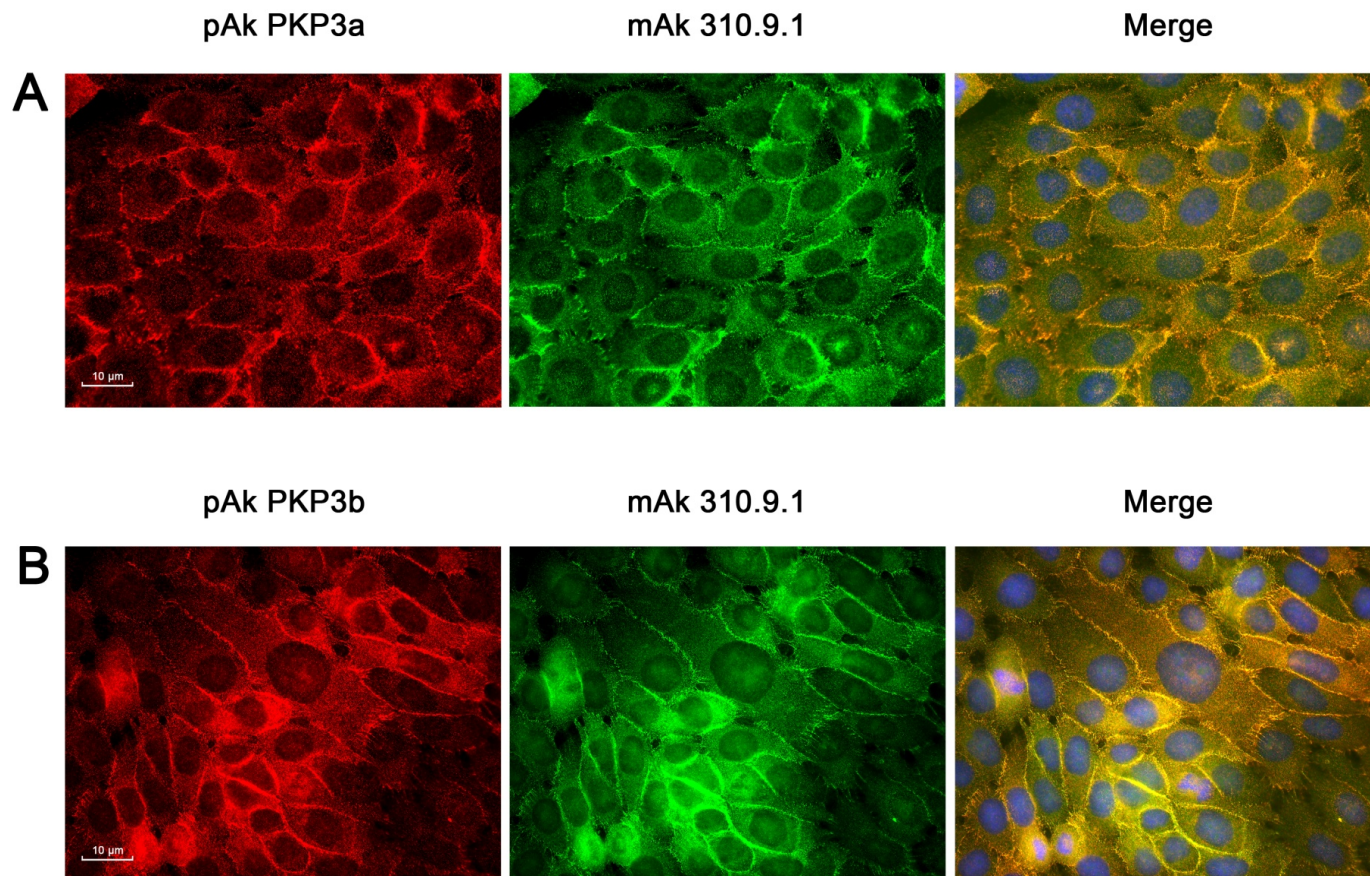


Abb. 4-17 Immunfluoreszenzdetektion von PKP3a und 3b in HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden angezüchtet und der Analyse zugeführt. Dargestellt ist in (A) die Anfärbung mit pAk PKP3a (rot; 1:250) und mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:50) sowie die Überlagerung beider Färbungen und Kernfärbung mit DAPI (rechts), in (B) die Anfärbung mit pAk PKP3b (rot; 1:500) und mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:200) sowie die Überlagerung beider Färbungen und Kernfärbung mit DAPI (rechts). Sowohl die Färbung mit PKP3a als auch PKP3b ergaben das einheitliche Bild der desmosomalen Färbung. Es fand sich kein Unterschied zur Doppellokalisierung mit dem „pan-markierenden“ monoklonalen Antikörper. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld dargestellt.

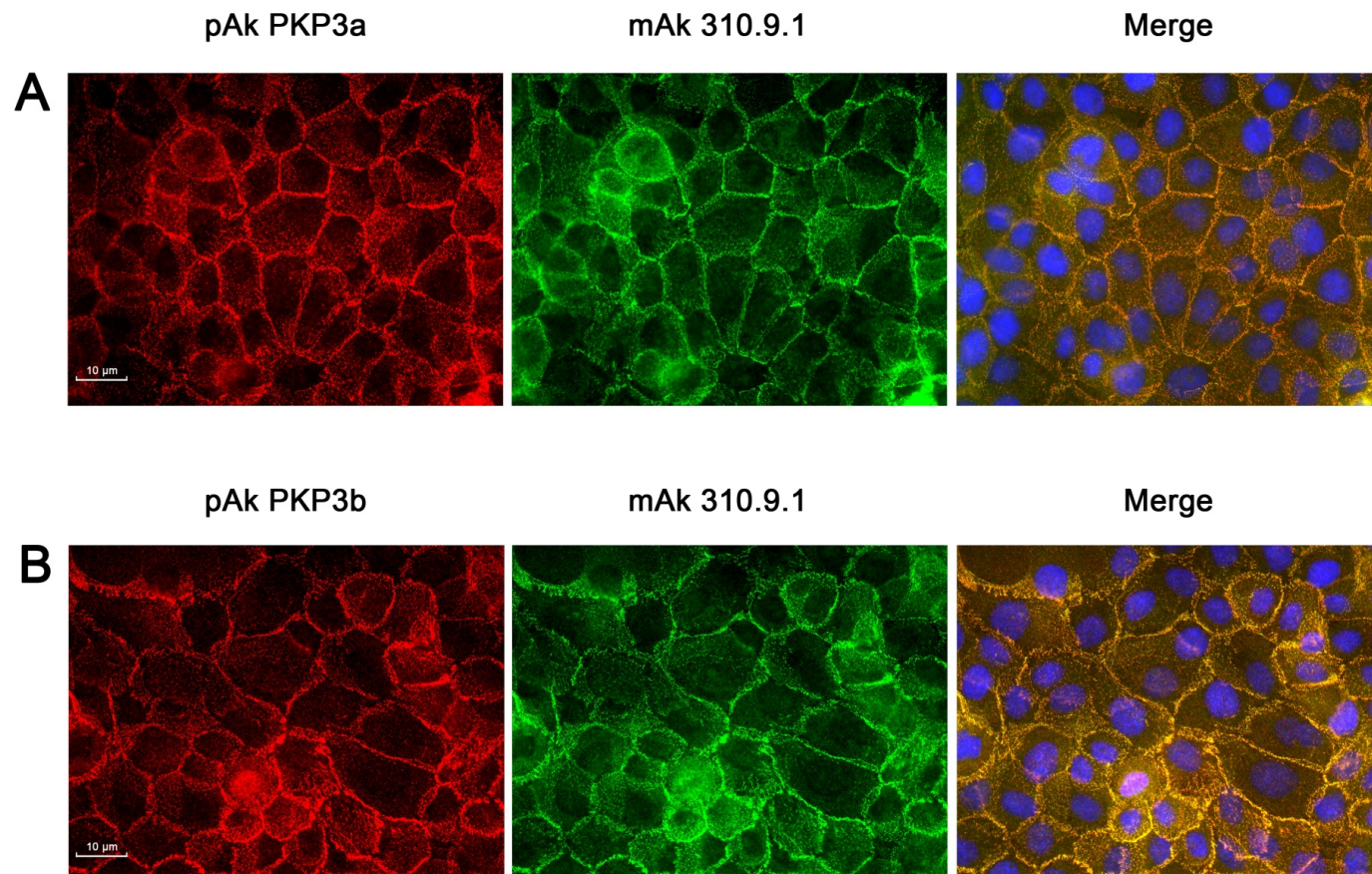


Abb. 4-18 Immunfluoreszenzdetektion von PKP3a und 3b in A431-Zellen

A431-Zellen wurden angezüchtet und analysiert. Dargestellt ist in (A) die Anfärbung mit pAk PKP3a (rot; 1:500) in Doppellokalisierung mit dem mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:50) sowie die elektronische Überlagerung beider Färbungen und einer Kernfärbung mit DAPI (rechts). In (B) wird die Anfärbung mit pAk PKP3b (rot; 1:500) in Kombination mit dem mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:200) sowie die Überlagerung beider Färbungen inklusive DAPI-Färbung gezeigt (rechts). Sowohl PKP3a als auch PKP3b lokalisierte in den Desmosomen von A-431 Zellen. Hier waren bei keiner der Varianten Bereiche zu finden, wo ausschließlich eine Variante nachweisbar war. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld dargestellt.

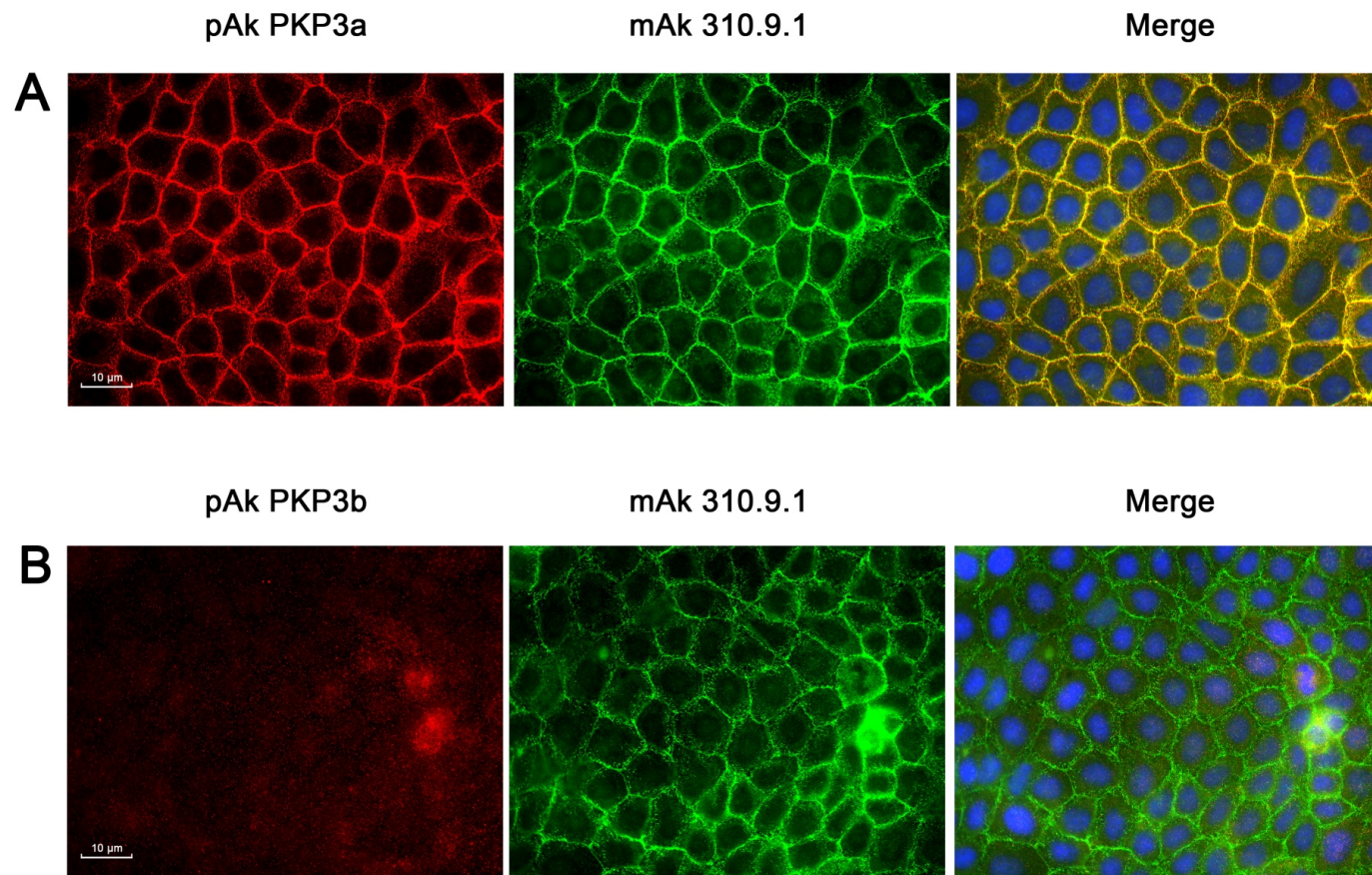


Abb. 4-19 Immunfluoreszenzdetektion von PKP3a und 3b in CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen wurden angezüchtet und analysiert. Dargestellt ist in (A) die Anfärbung mit pAk PKP3a (rot; 1:250) und die Doppelfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:50) sowie die Überlagerung beider Färbungen, einschließlich einer Kernfärbung mit DAPI (rechts). PKP3a war in den CaCo-2 Zellen in den Desmosomen nachweisbar und wies eine komplette Übereinstimmung der Färbung mit dem monoklonalen Antikörper PKP3-310.9.1 auf. In (B) ist die Anfärbung mit pAk PKP3b (rot; 1:500) und die Doppelfärbung mit dem mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:200) sowie die Überlagerung beider Färbungen inklusive der Kernfärbung mit DAPI (rechts) zu sehen. Im Gegensatz zur bekannten Variante wurde PKP3b in CaCo-2 Zellen nicht nachgewiesen. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld dargestellt.

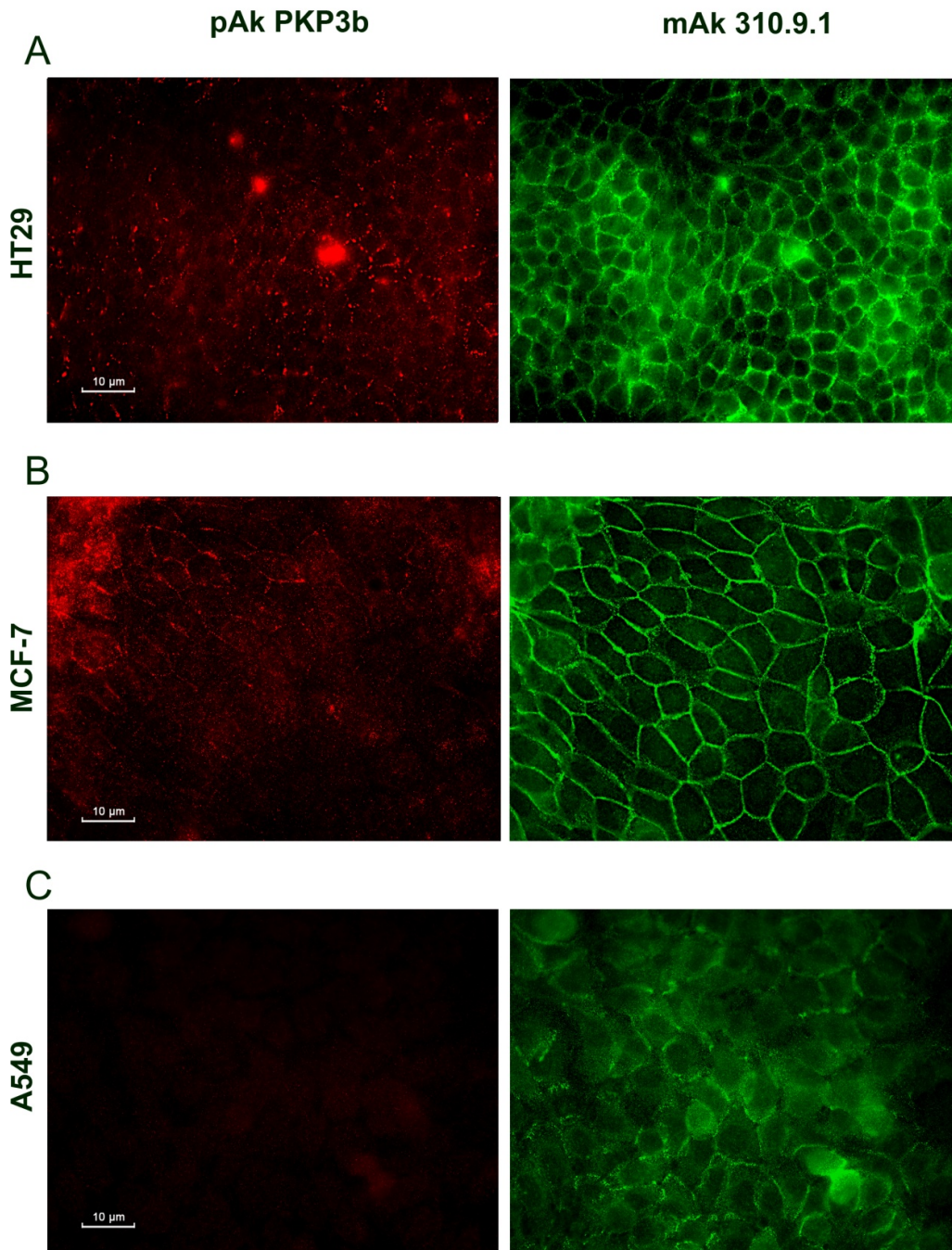


Abb. 4-20 Immunfluoreszenzanalyse der Zelllinien HT29, MCF-7 und A549

HT29, MCF-7 und A549 Zellen wurden angezüchtet, fixiert und analysiert. Dargestellt sind HT29-Zellen (A), gefärbt mit pAk PKP3b (rot, 1: 500) und mAk PKP3-310.9.1 (grün, 1:500). Die Markierung mit diesem Antiserum zeigte hier nur eine punktförmige desmosomale Färbung. PKP3b schien in seiner Expression in dieser Zelllinie deutlich reduziert zu sein. MCF-7-Zellen (B) gefärbt mit pAk PKP3b (rot, 1:500) und mAk PKP3-310.9.1 (grün, 1:500). Auch hier war das Färbemuster nicht homogen. Neben Zellen, die eine deutliche Reaktion mit dem Antiserum aufwiesen, ist der überwiegende Teil der Zellen negativ. A549-Zellen (C) gefärbt mit pAk PKP3b in Rot (1:500) und mAk PKP3-310.9.1 in Grün (1:500). A549 Zellen reagierten nicht mit dem Antikörper gegen PKP3b.

4.2.4.3 Expressionsnachweis des PKP3a und PKP3b in Gewebe

Nachdem die Expression von PKP3a und PKP3b in kultivierten Tumorzelllinien untersucht worden war, sollte ein Expressionsnachweis in primärem und tumorösem Gewebe durchgeführt werden.

Dazu wurden aus dem Institut der Pathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg humane Bauchhaut-Gewebe-Präparate akquiriert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Gefrierschnitte wurden wie unter 3.5 beschrieben, vorbehandelt und mit den polyklonalen Antiseren für PKP3a und PKP3b inkubiert. Zusätzlich wurde der mAk PKP3-310.9.1 in einer Doppelfärbung zur Markierung beider Varianten genutzt. Die Auswertung erfolgte mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss).

Gefrierschnitte der Bauchhaut (Abb. 4-21 A und B) und des Dünndarms (Abb. 4-21 C und D) wurden in Doppelfärbung mit Aks gegen PKP3a (A' und C'), PKP3b (B' und D') oder dem *pan*-reagierenden mAk PKP3-310.9.1 (A bis D) analysiert. Der *pan*-PKP3-Ak reagiert in der Haut (A und B) und dem Dünndarm (C und D) mit den Desmosomen, zusätzlich war vor allem in der Epidermis der Haut eine zytoplasmatische Färbung zu sehen. Das polyklonale Antiserum gegen PKP3a zeigte in der Haut (A') so gut wie keinen Unterschied im Färbemuster im Vergleich zum mAk PKP3-310.9.1 (in A'' bis D'' sind die überlagerten Fluoreszenzen und die Färbung mit DAPI abgebildet).

Gleiches ließ sich im Dünndarm nachweisen (C'). Die epithelialen Zellen der Villi wurden von beiden Antikörpern in einem punktförmigen Muster entlang der lateralen Zellgrenzen angefärbt. Die Analyse der humanen Haut mit dem PKP3b-Ak zeigte in der Epidermis erneut ein gleichmäßige desmosomale Färbung (B'), jedoch ein heterogenes Ergebnis im Dünndarm (D'). Während alle desmosomalen Strukturen mit dem mAk PKP3-310.9.1 markiert wurden (D, weiße Pfeile), war PKP3b nur in den apikalen Desmosomen einiger Zellgruppen der Krypten und Villi nachweisbar (D' und D''; weiße Pfeilspitzen). In den Krypten (*Insert*; D bis D'') war das Färbemuster für PKP3b auf den apikalen Teil der Desmosomen beschränkt (D'), während der *pan*-Ak auch die lateralen Zellkontakte anfärbte (D). Zusätzlich fand sich neben der PKP3b-spezifischen Färbung eine nicht-spezifische Anfärbung von intrazellulärem Mukus in den Becherzellen (Stern).

Analog wurden Gefrierschnitte eines Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens (Abb. 4-22 A und B) und eines Adenokarzinoms des Colon sigmoideum (Abb. 4-22 C und D) mit Antikörper gegen PKP3a (A', C'), PKP3b (B', D') oder dem mAk PKP3-310.9.1 (A bis D) analysiert. Alle Tumorzellen des Plattenepithelkarzinoms reagierten stark in desmosomaler Lokalisation mit dem mAk, vor allem im Zentrum der Tumorzellnester mit weniger Intensität der weiter peripher gelegenen Zellen (A und B). Zusätzlich war eine zytoplasmatische Färbung nachweisbar. Fast die gleichen Strukturen der Tumorzellen wurden vom PKP3a-Ak markiert (A' und A''). Auch die Färbung mit dem pAk gegen PKP3b zeigte dieses Muster (B' und B''), jedoch schienen vereinzelte Tumorzellen weniger oder gar kein PKP3b zu exprimieren (Pfeile in B bis B''). Die nukleäre DNA wurde mit DAPI angefärbt (A'' und B'').

Die Analyse des Adenokarzinoms mit dem Antikörper gegen PKP3 (Klon PKP3-310.9.1; C und D) zeigte ein deutliches desmosomales Signal hauptsächlich in den apikalen Zellanteilen, jedoch mit weniger Intensität auch an den lateralen Zellgrenzen. Auch die Färbung mit pAk PKP3a zeigte dieses Muster (C'). Dagegen wies die Färbung mit pAk PKP3b ein restringiertes Färbemuster auf. PKP3b war nur in den apikalsten Desmosomen in einigen Tumorzellen nachweisbar, während andere komplett negativ waren (D'). Die rot gefärbten Aggregate in D'' repräsentierten Mukus aus Becherzellen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Plakophilin 3b in mehrschichtigen Epithelien (Haut und Plattenepithelkarzinom des Mundbodens) exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu fand sich eine reduzierte bis fehlende Expression in einschichtigen Epithelien (Dünndarm und Adenokarzinom des Colon sigmoideum).

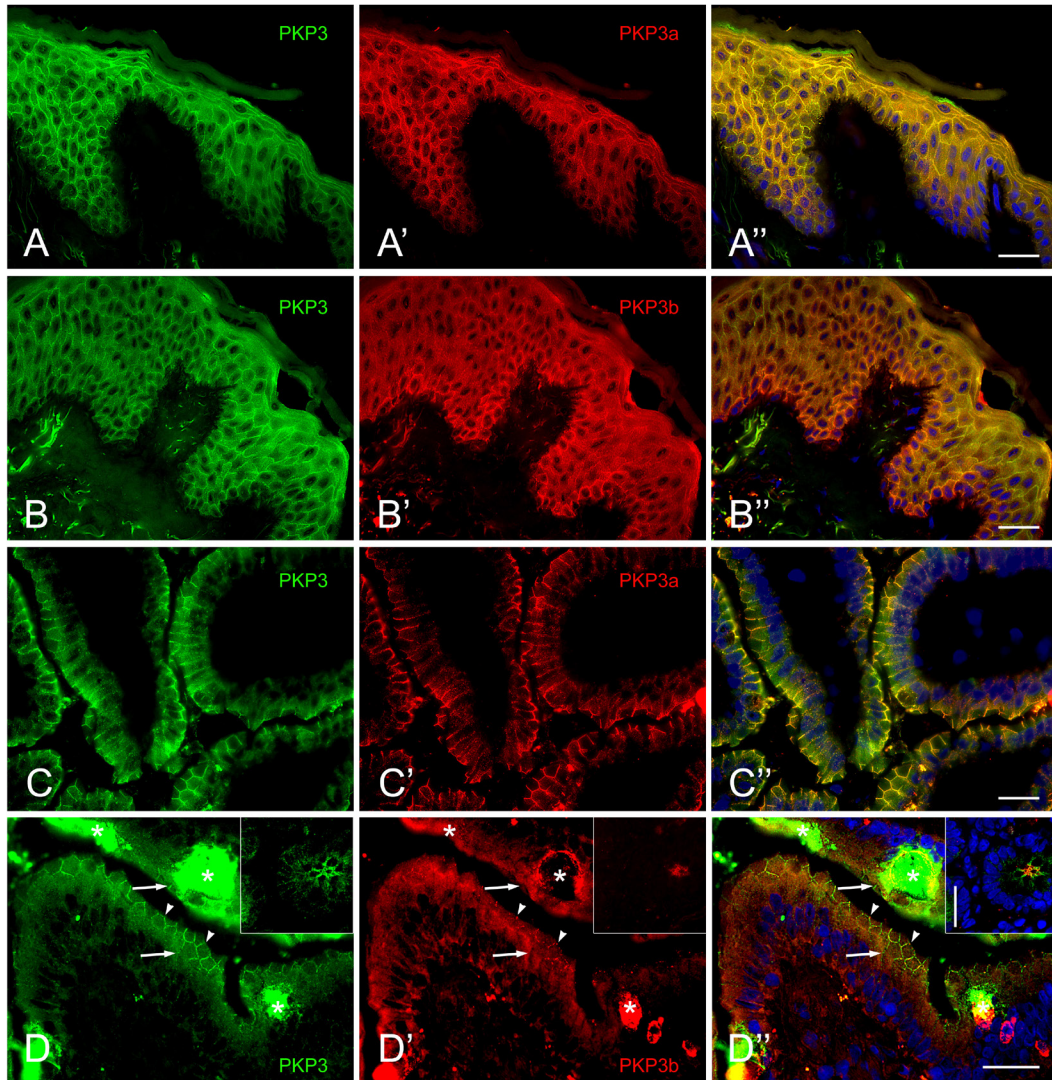


Abb. 4-21 Immunfluoreszenzdetektion von PKP3a und 3b in Gefrier-Gewebeschnitten von normalem Gewebe
 Gefrierschnitte von humaner Bauchhaut (A; B) und Dünndarm (C; D) wurden analysiert. Dargestellt ist in (A) die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3a (rot; 1:500) sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich der Färbung der Zellkerne mit DAPI (rechts). Die Desmosomen aller Zellschichten wurden durch sowohl das Antiserum als auch den monoklonalen Antikörper markiert. In (B) ist die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3b (rot; 1:500) dargestellt sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich einer DAPI-Färbung (rechts). Anders als bei PKP3a schienen hier besonders in den basalen Zellen die Desmosomen mit dem Antiserum markiert zu werden. Suprabasal nahm die Markierung mit dem pAk in den Desmosomen ab. (C) zeigt die Anfärbung des Dünndarms mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3a (rot; 1:500) sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich der Färbung der Zellkerne mit DAPI (rechts). Auch hier wurden die Desmosomen durch das Antiserum und den monoklonalen Antikörper markiert. In (D) ist die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100; weiße Pfeile) und pAk PKP3b (rot; 1:500) dargestellt sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich einer DAPI-Färbung (rechts). Die Anfärbung mit pAk PKP3b ist deutlich reduziert und nur auf einige Zellen beschränkt (D' und D''; weiße Pfeilspitzen).). Das *Insert* in D bis D'' repräsentiert einen Queranschnitt einer Krypte, der Stern intrazellulärem Mukus in den Becherzellen. Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld dargestellt.

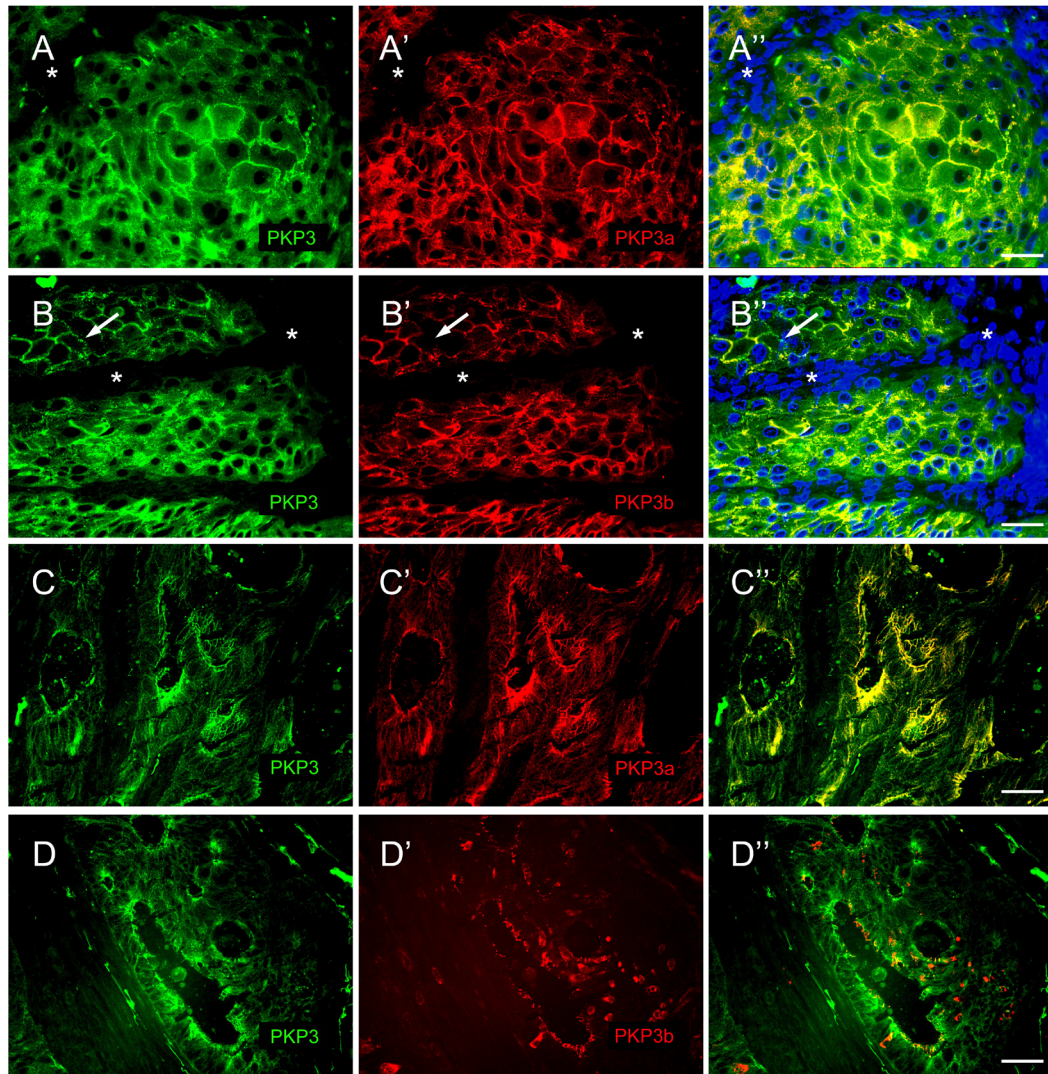


Abb. 4-22 Immunfluoreszenzdetektion von PKP3a und 3b in Gefrier-Gewebeschnitten von Tumoren

Gefrierschnitte eines Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens (A; B) und Adenokarzinoms des *Colon sigmoideum* (C; D) wurden analysiert. Dargestellt ist in (A) die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3a (rot; 1:500) sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich der Färbung der Zellkerne mit DAPI (rechts). Die Desmosomen wurden sowohl durch das Antiserum als auch den monoklonalen Antikörper markiert. In (B) ist die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3b (rot; 1:500) dargestellt sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich einer DAPI-Färbung (rechts). Anders als bei PKP3a schienen hier einzelne Tumorzellen weniger oder gar kein PKP3b zu exprimieren (Pfeile in B bis B''). Der Stern markiert Bindegewebe mit inflammatorischen Zellen. (C) zeigt die Anfärbung des Adenokarzinoms mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100) und pAk PKP3a (rot; 1:500) sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich der Färbung der Zellkerne mit DAPI (rechts). Auch hier wurden die Desmosomen durch das Antiserum und den monoklonalen Antikörper vornehmlich apikal, aber zum Teil auch lateral markiert. In (D) ist die Anfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 (grün; 1:100; weiße Pfeile) und pAk PKP3b (rot; 1:500) dargestellt sowie die Überlagerung beider Färbungen einschließlich einer DAPI-Färbung (rechts). Dagegen war pAk PKP3b nur in einigen Tumorzellen in den apikalsten Desmosomen nachweisbar (D'). Es ist das vorherrschende Gesichtsfeld dargestellt.

4.2.5 Immunhistochemische Analyse der Plakophilin 3-Varianten a und b in Paraffin-eingebetteten Geweben

Es sollte untersucht werden, ob die von uns generierten polyklonalen Antiseren auch in Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem humanen Gewebe die jeweiligen Plakophilin-Varianten detektieren konnten. Hierzu wurden Vulvahaut-Gewebeproben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der immunhistochemisch analysiert. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden, wie unter 3.6 beschrieben, vorbehandelt, entparaffiniert und im Autostainer Plus (Dako) mit den Antiseren gegen PKP3a und 3b inkubiert.

Die Inkubation des Vulvahaut-Gewebes mit dem polyklonalen Antiserum gegen Plakophilin 3a zeigte eine Lokalisation des PKP3a im Bereich der Zellmembranen, hier dargestellt in Abb. 4-23 A für die Epidermis und in B für die äußere Haarwurzelscheide im selben Gewebeschnitt. Diese Lokalisation repräsentiert eine Markierung der Desmosomen. Generell wiesen die Färbungen kaum Hintergrundsignal auf. Allerdings war die Qualität der Färbungen, auch unter Verwendung verschiedener Demaskierungsprotokolle für die Antigene sehr inhomogen und lokal begrenzt.

Die Inkubation des Gewebes mit pAk PKP3b zeigte eine Anfärbung desmosomaler Strukturen sowohl in der Epidermis (Abb. 4-23 C) als auch in der äußeren Haarwurzelscheide (Abb. 4-23 D). Bei Betrachtung des kompletten Gewebeschnittes fiel trotz der relativ hohen Verdünnung des Antiserums von 1:1.000 eine erhöhte Hintergrundfärbung des Gewebes mit PKP3b auf. Besonders gut konnten die Haarfollikel mit den Antiseren gegen die PKP3-Isoformen gefärbt werden, wohingegen die Epidermis selbst eine inhomogene Anfärbung aufzeigte.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass analog zu den Ergebnissen aus 4.2.4.3, beide PKP3 Isoformen in humanem Gewebe exprimiert wurden und vermutlich in desmosomalen Strukturen lokalisierten. Allerdings waren die beiden Antiseren für die Analyse von Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe nicht gut geeignet, da hier im Vergleich zu der Analyse von Gefrierschnitten Inhomogenitäten in der Färbung auftraten. Aus diesem Grund führten wir keine weiteren immunhistochemischen Färbungen an Paraffinmaterial zusätzlicher Gewebe durch.

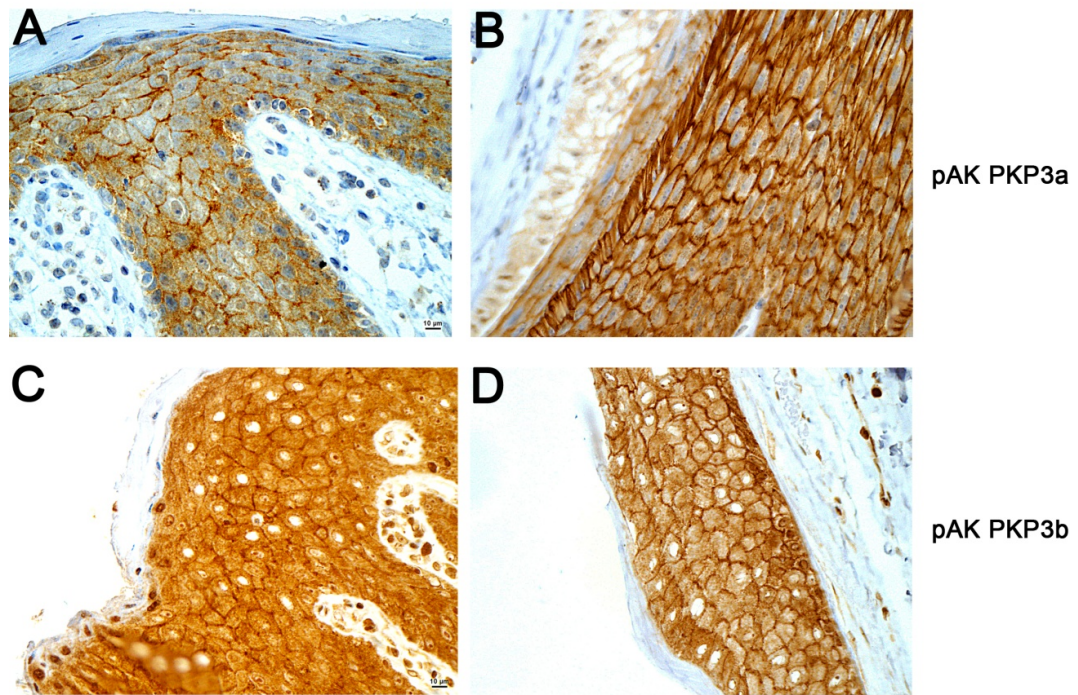


Abb. 4-23 Immunhistochemische Färbung von humanem Vulva-Gewebe zum Nachweis von PKP3a und PKP3b
Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden im Autostainer (Dako) mit den polyklonalen Antisera inkubiert und mit einem Durchlichtmikroskop (Leica) ausgewertet. Dargestellt in (A; Epidermis) und in (B; äußere Wurzelscheide eines Haarfollikels; Basalzellschicht rechts unten erfasst) die Färbung mit pAK PKP3a (1:150). (C; Epidermis) und (D; äußere Wurzelscheide eines Haarfollikels; Basalzellschicht rechts erfasst) zeigen die Färbung mit pAK PKP3b (1:1000, mit 0,001 % Triton X).

5 Diskussion

Der menschliche Körper, welcher in seiner kleinsten Einheit im Gewebe in Verbänden distinkter Zelltypen organisiert ist, braucht Zell-Zell-Verbindungen, um die Funktion und Homöostase des Gewebes aufrecht zu erhalten. Diese Verbindungen lassen sich morphologisch und funktionell in drei Klassen einteilen [25, 66]: *tight junctions* [66], *gap junctions* [61] und die Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zell-Verbindungen. Zu diesen zählen *adherens junctions* (*Zonulae adhaerentes*) und die Desmosomen (*Macula adhaerens*) [13, 103], deren Funktion vor allem die Polarität, mechanische Stabilität und Bewegung der Zellen beinhaltet.

Speziell Desmosomen, deren Bestandteil das in dieser Arbeit thematisierte Plakophilin 3 ist, sind in Geweben zu finden, die hohem mechanischen Stress ausgesetzt sind [31], kommen aber auch in nicht-epithelialen Zellverbänden vor [18, 50, 80]. Aufgebaut sind Desmosomen in variabler Zusammensetzung vor allem aus den Transmembranproteinen Desmoglein, Desmocollin und verschiedenen peripheren Proteinen wie den Plakophilinen, Desmoplakin und Plakoglobin, die dann ihrerseits die Intermediärfilamente als Zytoskelettbestandteil verankern [48, 23]. Das in dieser Arbeit behandelte Plakophilin 3 gehört zu einer Gruppe aus drei Proteinen (PKP1 – PKP3) mit charakteristischen Sequenzwiederholungen von 42/45 Aminosäuren, sogenannten *arm-repeats* und zählt somit zur Familie der *armadillo-repeat* Proteine [36]. Sie werden gewebespezifisch exprimiert [38, 81], haben aber alle die Eigenschaft, Desmoplakin und andere desmosomale Proteine an die Zytoplasma-Membran zu rekrutieren [32, 81, 91]. Außerdem wird ihnen eine Beteiligung an der intrazellulären Signalgebung zugeschrieben [17, 38]. Von Plakophilin 1 sind bisher zwei Spleißvarianten beschrieben worden, die sich durch Zelllokalisation und Funktion unterscheiden [83]. Auch für PKP2 sind zwei Spleißvarianten beschrieben worden. Diese scheinen jedoch koexprimiert zu werden und unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation [60].

Plakophilin 3 wird in fast allen Epithelien gefunden, jedoch nicht in Hepatozyten und Kardiomyozyten [10-11, 82]. Im Gegensatz zu PKP1 und 2 konnte für PKP3 noch keine weitere Spleißvariante nachgewiesen werden. Neben der Eigenschaft, diverse desmosomale Proteine zu binden, ist PKP3 anscheinend an der Bildung

des Desmosoms über Rekrutierung von E-Cadherin und Plakoglobin beteiligt [30, 65]. Auch außerhalb der Desmosomen finden sich verschiedene Interaktionspartner für PKP3, unter anderem einige Initiations- und Elongationsfaktoren der Proteinbiosynthese, sowie Enzyme der Glykolyse [24, 34-35, 38, 42, 62, 94]. Ob PKP3 eine Rolle bei translationalen Prozessen spielt, ist bisher nicht geklärt.

Die Rolle von Plakophilin 3 in der Tumorgenese ist bis heute widersprüchlich. Einerseits verhält sich PKP3 in einigen Tumoren ähnlich einem Tumorsuppressor [1, 51, 85]. Auf der anderen Seite fungiert PKP3 in anderen Karzinom-Typen als Onkogen [26].

Diese unterschiedlichen und zum Teil kontroversen Hinweise auf eine Rolle des PKP3 in der Tumorgenese zeigen eindrücklich, wie wenig über die genaue Funktion von PKP3 und deren Rolle in zellulären Prozessen verstanden ist.

5.1 Identifizierung weiterer Varianten von PKP3

Da für Plakophilin 1 und Plakophilin 2 jeweils zwei Spleißvarianten bekannt sind [60, 83] und zusätzlich in immunbiochemischen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe sich ein weiteres Polypeptid mit Hilfe von PKP3-spezifischen Antikörpern anfärben ließ (A. Schmidt, mündliche Mitteilung), bestand der Verdacht, dass es auch für Plakophilin 3 eine weitere Spleißvariante geben könnte. Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine weitere Variante von PKP3 nachzuweisen und zu charakterisieren.

5.1.1 Sequenzsuche in öffentlichen Datenbanken

Dazu wurde, wie unter 4.1.1 beschrieben, ein Sequenzabgleich mit EST-Datenbanken vorgenommen, der den Klon DA439471.1 hervorbrachte [46], welcher sich im Bereich des 5'-Endes von der bisher bekannten Plakophilin-Sequenz unterscheidet. Die ersten 94 Nukleotide stammen aus einer Region ca. 1600 Basen vor der Sequenz des bekannten Exon 1 von PKP3 auf Chromosom 11p15 [65]. Dieses potentiell neue Exon wurde in dieser Arbeit als Exon-1 bezeichnet. Betrachtet man die Sequenzen auf genomischer Ebene, so finden sich Spleißstellen am Übergang des hier neu definierten Exons-1 zum folgenden Intron und eine Spleißakzeptorstelle in der kodierenden Sequenz der veröffentlichten mRNA-Sequenz von PKP3. Teile des bisherigen ersten Exons würden somit als Intron

erkannt und herausgeschnitten werden. Dieser Vorgang wird als alternatives Spleißen bezeichnet [9].

5.1.2 Nachweis der neuen Variante

Um herauszufinden, ob die Sequenz des identifizierten EST-cDNA-Klons transkribiert wird, wurden aus Gesamt-RNA Präparationen von HaCaT- und A431-Zellen mittels reverser Transkription mit spezifischen *Primer*, abgeleitet aus der Sequenz von DA439471.1 und der bekannten PKP3-Sequenz, cDNAs generiert und sequenziert (siehe 4.1.2). Die so erhaltenen cDNAs entsprachen am 5'-Ende dem EST-Klon, wechselten dann in die bereits bekannte cDNA-Sequenz, und sind über den gesamten restlichen kodierenden Bereich identisch (Abb. 4-4). 4 identifizierte Basenaustausche an den Positionen 1406 (449. AS des PKP3a), 1475 (472. AS des PKP3a), 2174 (705. AS des PKP3a) und 2411 (784. AS des PKP3a) sind stumm, und führten zu keiner Veränderung des Leserahmens. Der Abgleich dieser Sequenzunterschiede mit den in der SNP-Datenbank von NCBI für PKP3a hinterlegten SNPs ergab für alle 4 Mutationen bekannte Polymorphismen (Tab. 5-1).

Position	Aminosäure	1. und 2. Nukleotid	SNP im humanen PKP3-Gen
449	Threonin	AC	G oder A
472	Alanin	GC	G oder A
705	Prolin	CC	A oder G
784	Phenylalanin	TT	T oder C

Tab. 5-1 Einzel-Nukleotidpolymorphismen (SNP) der PKP3-Gensequenz

5.1.3 Erweiterung des 5'-Bereichs der PKP3b-mRNA

Da sich 3'-wärts der neu identifizierten Sequenz keine Veränderungen zur bisher beschriebenen Sequenz zeigten, konnte man davon ausgehen, dass die amplifizierte cDNA der neuen Variante 3'-wärts den kompletten kodierenden Bereich umfasst. Dagegen war der 5'-Bereich möglicherweise noch nicht komplett identifiziert, was Einfluss auf den kodierenden Bereich haben könnte. Eine Analyse der

in Frage kommenden genomischen Sequenzen zeigte, dass die potentielle Sequenz mit 72.6 % sehr GC-reich ist und somit stabile Sekundärstrukturen in der mRNA ausbilden könnte. Da Sekundärstrukturen zum Syntheseabbruch der Reversen Transkriptase führen können [22], gestaltete sich die Vervollständigung der 5'-aufwärts gelegenen Sequenz als schwierig. Es wurden verschiedene Methoden eingesetzt, um eine weiterführende Nukleotid-Abfolge der neuen mRNA zu erhalten. Unter anderem wurden verschiedene kommerzielle Systeme, wie das FirstChoice[®] RLM-RACE (Ambion) verwendet, welches in Kombination mit dem GC-Puffer des Anbieters gut geeignet ist für die Amplifikation von *ge-cappten* mRNAs GC-reicher Gene. Allerdings führte keine der verwendeten Methoden zu weiteren Sequenzinformationen. Ebenso wurde ein klassischer Ansatz zum Ermitteln des Transkriptionsstartes mittels *Primer Extension*-Analyse durchgeführt, der ebenfalls keinen Erfolg brachte.

Erfolgreich stellte sich eine modifizierte RACE-Methode, wie von Shi und Jarvis beschrieben [86], heraus. Diese nutzt neben herkömmlichen Elementen wie der Ligation einer doppelsträngigen Adapter-Nukleinsäure auch Neuerungen wie die Verwendung von Homoectoin in der Reaktion. Dieses wirkt ähnlich wie Betain oder DMSO in PCR-Reaktionen Schmelzpunkt-absenkend und „schmilzt“ kompakte Sekundärstrukturen in Nukleinsäuren auf [84]. Hierdurch konnte eine Verlängerung der 5'-Sequenz der mRNA der neuen Variante von PKP3 erreicht werden. Es stellte sich aber heraus, dass diese keinen Einfluss auf den Beginn des kodierenden Bereichs hat. Alternativ wurde ein direkter PCR-Ansatz mit weiter 5'-wärts gelegenen Oligonukleotiden getestet. Auch hierdurch konnte keine Verlängerung des möglichen Transkriptionsstartes ermittelt werden (4.1.3). Somit wurde davon ausgegangen, dass der kodierende Bereich der PKP3b-mRNA und demzufolge auch die resultierende Aminosäure-Sequenz von PKP3b vollständig sind.

Man kann aufgrund der hier vorgelegten Daten deshalb davon ausgehen, dass es eine Variante von Plakophilin 3 gibt, welche als mRNA in Zellen transkribiert wird. Die ersten 112 Nukleotide unterscheiden sich bei Beibehaltung des Leserahmens von den ersten 111 Nukleotiden von PKP3a. Vergleicht man die daraus resultierenden Aminosäure-Sequenzen, ergibt sich ein neuer 27 AS-langer Abschnitt, der sich von den ersten 12 AS des PKP3a unterscheidet (Abb. 4-5). Die in

der vorliegenden Arbeit beschriebene Variante des menschlichen Plakophilin 3b findet anscheinend auch ein entsprechendes Pendant im Mausgenom. Wir konnten in entsprechenden Datenbanken für EST-cDNA-Klone der Maus einzelne cDNA-Sequenzen identifizieren, welche dieselben Eigenschaften aufweisen wie die menschliche EST-cDNA-Sequenz DA439471.1. Auch bei diesen Maus cDNA-Sequenzen wurden 5'-wärts gelegene genomische Bereiche gefunden, welche in die entsprechende Stelle in der bekannten cDNA-Sequenz des murinen PKP3 eingespleißt werden. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz ist in den cDNA-Klonen der Maus um 13 Aminosäuren am Aminoterminal länger, ohne dass sich ein Start-Methionin an der entsprechenden Stelle der menschlichen Sequenz findet (A. Schmidt, persönliche Mitteilung). Es konnte von Sklyarova et al. [87] und in Untersuchung der eigenen Knockout Maus gezeigt werden, dass PKP3-defiziente Mäuse Abnormalitäten im Aufbau der Haarschäfte aufweisen. Da in den genannten Arbeiten die Exons 2 bis 4 des PKP3-Gens der Maus entfernt wurden, würden somit beide PKP3-Varianten der Maus inaktiviert werden. Unsere Ergebnisse weisen demnach darauf hin, dass bei der Genese der Haarfollikel nicht nur die bekannte Variante eine Rolle spielt, sondern auch die neue Variante PKP3b am Aufbau der Zell-Zell-Verbindungen beteiligt sein könnte und möglicherweise auch zu dem beschriebenen Phänotyp beiträgt. Auch in weiteren Wirbeltierspezies, wie bei weiteren Primaten, Rind sowie Ratte gibt es Hinweise, dass das Plakophilin 3-Gen eine Fortführung in 5'-Richtung aufweist.

5.2 Proteinexpressionsanalysen der Variante PKP3b

Um die Translation der mRNA von PKP3b zu überprüfen, wurden polyklonale Antikörper für PKP3a und PKP3b in Kaninchen generiert (siehe 3.3). Ihre Spezifität ließ sich sowohl in *Western Blot* Analysen (Abb. 4-13) als auch in der Immunfluoreszenz hinreichend nachweisen (Abb. 4-14; Abb. 4-15; Abb. 4-16).

Plakophilin 3 ist bisher sowohl in einschichtigen als auch mehrschichtigen Epithelien beschrieben worden [11]. Epitheliale Zelllinien aus unterschiedlichen Herkunftsgeweben wurden für Expressionsanalysen verwendet. So wurden für mehrschichtige Epithelien HaCaT- und A431-Zellen verwendet und für einschichtige

Epithelien CaCo-2-Zellen. Außerdem wurden native Leberkarzinomzellen (PLC) und stabil mit den cDNAs beider Varianten transfizierte PLC-Zellen untersucht. Die nativen PLC-Zellen zeigten analog zu bisherigen Ergebnissen keine PKP3a- oder PKP3b-Expression [82]. Erst nach Transfektion konnten die Varianten mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern gegen beide Varianten immunbiochemisch und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden. Hierdurch konnte auch die Spezifität für die generierten Antiseren gegen beide PKP3-Varianten bestätigt werden. Das Antiserum gegen die neue Variante PKP3b zeigte ausschließlich Reaktionen in PLC-Zellen, die mit der entsprechenden cDNA-Variante transfiziert wurden. Gleiches konnte entsprechend auch für das Antiserum gegen die ursprüngliche Variante PKP3a gezeigt werden.

Wie zu erwarten, ließ sich PKP3a mit Hilfe des polyklonalen Antiserums in den untersuchten epithelialen Zelllinien HaCaT, A431 und CaCo-2 in desmosomalen Strukturen nachweisen. Für PKP3b konnte in den Zelllinien HaCaT und A-431 ebenfalls eine desmosomale Lokalisation gezeigt werden, in der einschichtigen Tumor-Epithelzelllinie CaCo-2 wurde dagegen keine Expression nachgewiesen. Der PKP3-spezifische monoklonale Antikörper PKP3-310.9.1 [82] konnte dagegen ebenfalls in allen getesteten Zelllinien PKP3 in den Desmosomen markieren. Unerwartet war die komplett fehlende Expression von PKP3b in CaCo-2-Zellen, die weder immunbiochemisch noch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachweisbar war. Etwaige Expressionsmuster-Wechsel aufgrund von Stress der Zellen, wie es schon für andere Gene beschrieben worden ist [3, 64], konnten in der Zellkultur anhand mikroskopischer Beurteilung ausgeschlossen werden, zumal das isolierte Proteinmaterial für den Nachweis beider Varianten aus derselben Proteinextraktion von CaCo-2 Zellen entstammte. Hingegen ist bekannt, dass sie im Passagenverlauf heterogene Subklone ausbilden. Dabei kann es vorkommen, dass die ursprüngliche aus einem Adenokarzinom isolierte Linie sich differenziert und charakteristische Eigenschaften einer polaren Darmepithelzelle ausweist [77]. Trotz dieser in der Literatur beschriebenen Beobachtung kann die fehlende PKP3b-Expression vermutlich nicht auf eine Heterogenität der CaCo-2 Zellen zurückgeführt werden, da die Zelllinie in den durchgeführten Experimenten durchweg einheitlich reagierte.

Um die Expression beider PKP3-Varianten in anderen einschichtigen Epithelien zu untersuchen, wurden weitere Zelllinien einschichtiger Epithelien bzw. Zylinderepithelien in der Immunfluoreszenz analysiert. Dazu wurden dementsprechend die Zelllinien HT29, MCF-7 und A549, alle Tumorzelllinien mit Epithel-Ursprung, Immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

Die Colonkarzinom-Zelllinie HT29 zeigte eine PKP3b-Expression, die jedoch sehr schwach ausgeprägt war. So ließen sich nur einzelne punktförmige Reaktionen entlang der Zellgrenzen einzelner Zellen ausmachen. Die Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen PKP3 zeigte jedoch eine starke Anfärbbarkeit entlang der vollständigen Zellgrenzen. PKP3b wird in diesen Zellen nur schwach exprimiert, und die deutliche Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper wurde durch eine starke PKP3a Färbung erzeugt.

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigte ein heterogenes Bild. So waren partiell Zellen negativ für PKP3b, während andere Zellen eine deutliche Reaktion mit entsprechender desmosomaler Lokalisation aufwiesen. Es scheint, als ob die Kultur aus mehreren Subklonen derselben Zelllinie bestand. Dabei ist allerdings nicht klar, ob eine Mischpopulation aus anscheinend unterschiedlichen Subklonen bezüglich der Expression von PKP3b bereits mit der Etablierung der Zelllinie oder erst sekundär während der Kultivierung entstanden ist. Weiterhin ist für MCF-7-Zellen beschrieben worden, dass sie einen Fibroblasten-ähnlichen Zellcharakter annehmen können und dadurch kein oder weniger Desmoplakin exprimieren [90]. Dieses könnte erklären, warum nur teilweise Markierungen für PKP3b zu finden waren.

Die analysierte Zelllinie A549, eine Alveolarzellkarzinom-Linie, zeigte dagegen keine Expression von PKP3b. Die Doppelfärbung mit mAk PKP3-310.9.1 gegen beide PKP3-Varianten erbrachte in dieser Zelllinie allerdings eine positive Reaktion, auch wenn das Signal aufgrund der Morphologie und des Wachstumsverhaltens der Zelle nicht deutlich ausgeprägt war. Daher ist anzunehmen, dass A549-Zellen in ihren Desmosomen PKP3a, aber kein PKP3b enthalten.

Das mehrschichtige Epithel der Bauchhaut ließ sich mit den Antikörpern in der Immunfluoreszenzfärbung gut untersuchen und zeigte sowohl für PKP3a als auch für die neue Variante Plakophilin 3b eine positive Expression. Auffällig war jedoch eine scheinbar erhöhte Anfärbbarkeit des PKP3b in den basalen Schichten

der Epidermis, welche nicht in der Gegenfärbung mit dem monoklonalen Antikörper zu beobachten war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der monoklonale Antikörper zwar auch eine erhöhte Anfärbbarkeit bezogen auf seine PKP3b-Reaktion für die basalen Zellen besaß, jedoch in der Summe durch sein Epitop für beide Varianten diese nicht zur Darstellung brachte. Denkbar ist auch eine Reziprozität der Expression beider Varianten. Während PKP3b basal stärker exprimiert wird und suprabasal in der Expression vermindert ist, tritt in der Bauchhaut PKP3a in den basalen Zellen weniger stark auf, als in den suprabasalen Schichten der Epidermis. Eine andere Erklärung wäre eine unspezifische Färbung des polyklonalen Antiserums gegen PKP3b, welche noch ein anderes Epitop eines anderen Proteins erkennen könnte. Dies kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich. Analog zu den Zellkultur-Experimenten zeigte sich im einschichtigen Dünndarmepithel eine reduzierte Anfärbbarkeit, einhergehend mit einer reduzierten bzw. fehlenden Expression von PKP3b. Dies kann als Hinweis darauf gewertet, dass PKP3b nur zu bestimmten Zeitpunkten der Differenzierung der Enterozyten gebildet wird und vor- und nachher lediglich PKP3a exprimiert wird. Ob und zu welchem Differenzierungszeitpunkt allerdings die Ko-Expression von PKP3b in Enterozyten erfolgt, ist zur Zeit noch offen und muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Immunfluoreszenzfärbung der Tumore, so zeigte sich hier ein weitgehend identisches Bild mit vermehrter Färbung des mehrschichtigen Plattenepithelkarzinoms, jedoch negativer oder stark reduzierter Expression im einschichtigen Adenokarzinom. PKP3a ließ sich dagegen in allen vier Gewebetypen nachweisen. Mit Sicherheit lässt sich abschließend feststellen, dass PKP3b in humanem Gewebe exprimiert wird.

Nach den Immunfluoreszenz-basierten Analysen wurde humanes Gewebe auch in der Paraffinschnitt-Immunhistochemie auf Expression von PKP3a und PKP3b untersucht. Das dazu verwendete Gewebe der Kopfhaut zeigte eine Anfärbbarkeit in der Epidermis und auch in der Haarscheide. Kongruent dazu waren die Ergebnisse für PKP3a. Jedoch erzeugte das polyklonale Antiserum für Plakophilin 3b ein hohes Hintergrund-Signal, obwohl es in einer hohen Verdünnung eingesetzt wurde. Die in den Immunfluoreszenzanalysen festgestellte erhöhte Anfärbbarkeit

der basalen Schichten der Epidermis mit dem polyklonalen PKP3b-Antikörper konnte in Gewebeschnitten durch die Paraffinschnitt-Immunhistochemie-Analyse bestätigt werden.

Das Expressionsverhalten der von uns beschriebenen neuen Variante von PKP3 in epithelialen Kulturzellen erscheint heterogen und ein echter Zusammenhang zur Herkunft der Kulturzellen als nicht eindeutig. Hinweise auf differentielle Expression werden jedoch sowohl durch die Zellkultur-Experimente als auch die immunhistochemischen Untersuchungen an ein- und mehrschichtigen Geweben bestätigt. Es sollte zunächst der Zustand der Expression der Variante PKP3b in somatischen Geweben vollständig untersucht werden, bevor man Rückschlüsse auf eine Beibehaltung oder Änderung der Expression bei entarteten Zellen der entsprechenden Gewebe vornimmt. Die Analyse der Gewebe hat mit den zurzeit verfügbaren Reagenzien nicht zu eindeutigen oder befriedigenden Ergebnissen geführt. Zum einen waren die spezifischen Antiseren nur bedingt in der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten Formalin-fixierten Gewebes einsetzbar, da hier bisweilen deutliche Probleme bei der Antigendemaskierung und zum Teil starke Hintergrundreaktionen auftraten. Starke Hintergrundreaktionen erschwerten ebenfalls eine eindeutige Analyse in einigen Geweben, die durch Immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen von Gefriergeweben untersucht wurden. Hier muss die Generierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern mit niedrigerer Hintergrundreaktion abgewartet werden, um klar definierbare Ergebnisse zu erhalten. Dennoch zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die Varianten PKP3a und PKP3b differentiell exprimiert werden und letztere offenbar eine präferentielle Expression in stratifizierten bzw. Plattenepithelien zeigt.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine neue, bisher nicht beschriebene Variante für Plakophilin 3 nachgewiesen werden. Diese Variante PKP3b unterscheidet sich von der bisher bekannten Version durch ein zusätzliches Exon am 5'-Bereich mit einer Verlängerung des Aminoterminus. PKP3b konnte in mehrschichtigen Epithelien in Desmosomen-typischer Lokalisation nachgewiesen werden. In einschichtigen Epithelien zeigten sich nicht ganz eindeutige Ergebnisse, jedoch scheint hier die

Expression von PKP3b herunter reguliert zu sein. Somit scheint eine Gewebespezifität für die neue Variante zu bestehen. Unterstützt wird diese Vermutung durch Arbeiten aus unserer Gruppe [106], welche zeigten, dass es vor dem neu beschriebenen Exon -1 einen 3298 Basenpaare langen Sequenzbereich gibt, welcher eigene genregulatorische Eigenschaften besitzt und sich anscheinend von den bisher beschriebenen Promotorstrukturen für PKP3 unterscheidet. So weist der für die Variante PKP3b definierte Promotorbereich in Reporter-genuntersuchungen keine Aktivität in der Zelllinie CaCo-2 auf, was sich mit den immunbiochemischen und -zytologischen Untersuchungen deckt. Auch die Zelllinie PLC, welche negativ für die PKP3-Expression ist, zeigte in den Reporter-genuntersuchungen nicht nur keine Aktivität, sondern hier scheint sogar ein sehr effektiver Hepatozyten-spezifischer *Silencer* lokalisiert zu sein, der selbst eine geringe Basisaktivität der entsprechenden Kontrollen in dieser Zelllinie unterdrückt. In diesem Bereich zeigte sich nach *in-silico* Analyse mit dem frei zugänglichen Analyse-Programm TFSEARCH, dass hoch konservierte potentielle Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel C/EBP (*CAAAT/ Enhancer-Binding Protein*) und HSF2 (*Heat Shock Factor 2*) existieren. Dabei befindet sich bereits 103bp aufwärts des mutmaßlichen Startkodons eine konservierte Bindesequenz für C/EBP. Außerdem konnte eine Bindung vermutlich des Faktors an diese Transkriptionsfaktor-Sequenzen mittels Elektromobilitäts-*Shift-Assay* (EMSA) nachgewiesen werden [106].

Multiple, aber meist strukturell nahe verwandte Proteine aus einem Gen entstehen durch eine komplexe Maschinerie von Faktoren, welche durch verschiedene Mechanismen zu diversen Isoformen führen. Neben dem alternativen Spleißen [67] oder post-transkriptionellen Modifikationen werden wie bei PKP3b auch andere Promotorsequenzen genutzt. Beispiel hierfür ist unter anderem das p63-Gen, deren resultierende Proteinisoformen differentielle Funktion besitzen [101]. Dies steht im Gegensatz zu den Spleißformen der anderen Plakophiline, die aus konventionellen Spleißvarianten bestehen.

Es ist möglich, dass PKP3b in anderen differentiellen Situationen als für PKP3a zutreffend transkribiert wird. Dafür könnten Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, die spezifisch an regulative Sequenzen von PKB3b binden [106].

C/EBP spielt eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten, indem es (-)-Epigallocatechin-3-gallat, einem Bestandteil von grünem Tee induziert [5]. Weiterhin interessant im Zusammenhang mit PKP3b ist die Tatsache, dass C/EBP vielfältige Aufgaben im Bereich der Differenzierung und Proliferation, aber auch im Metabolismus und bei Entzündungsprozessen inne hat. Dieses könnte im Zusammenhang mit dem Nachweis von PKP3 als Bestandteil der zellulären Antwort auf Stress von Bedeutung sein [42]. C/EBP ist ebenfalls an der Regulation der Genexpression von Desmocollin 1 und 3 beteiligt und somit interessant im Zusammenhang mit der Regulation der von uns beschriebenen Variante [88].

Ebenfalls an der Stressantwort von Zellen ist der HSF2 beteiligt. Durch einen Hitzeschock der Zellen wird HSF2, ein zytoplasmatisch vorkommender Transkriptionsfaktor, aktiviert und transloziert in den Zellkern [74].

Für PKP3a wurde der E-Cadherin-Repressor ZEB1 als Regulator in invasiven Mammakarzinom-Zellen beschrieben, sowohl für die Spezies Mensch als auch Maus [1]. ZEB1 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle, Mobilität von Zellen und der Transition von epithelialem zu mesenchymalem Gewebe (EMT) steht [16]. Dieses Protein bindet E-Box-Elemente und reguliert die Expression von E-Cadherin, ZO1 und PKP3 herunter mit der Folge des Wechsels des zellulären Phänotyps eben von epithelial zu mesenchymal. Ein Zusammenhang zur Expression der von uns gefunden Variante PKP3b sollte überprüft werden. Im murinen Gen für *Pkp3* wurden 7 potentielle E-Box-Motive identifiziert, zwei davon konserviert zwischen den Spezies Mensch und Maus nahe des PKP3a-Promotors und zwei weitere ca. 2kb weiter 5'-wärts, hier in der Nähe des potentiellen PKP3b-Promotors. Die ersten beiden sind in Reporter-Gen-Assays mit einer eindeutigen Herunterregulation von PKP3a beschrieben, während die letzten beiden keinen oder nur geringen Einfluss auf die Regulation zu haben scheinen. Zusätzlich wurde spekuliert, dass in Colonkarzinomen im Grenzbereich des Tumors ZEB1-Expression koinzidentell mit der EMT einhergeht und ein Wechsel des PKP3-Expressionsmuster damit korreliert. Während ZEB1 stark exprimiert wurde, zeigte sich PKP3 reduziert, ausgenommen rudimentärer zytoplasmatischer Anteile. Daher könnte man spekulieren, dass dieser Anteil das nicht durch die Regulation von ZEB1 beeinflusste

PKP3b sein könnte. Weitere Studien sind hier nötig, um die Rolle von PKP3b an der invasiven Front von Karzinomen zu beschreiben, insbesondere vor dem Hintergrund der Diagnostik oder Therapie.

Weiterhin sollte die Gewebespezifität ausführlicher untersucht werden, um die Rolle von PKP3b bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase zu überprüfen. Verschiedene Gewebe sollten sowohl der immunbiochemischen Analyse als auch Immunfluoreszenz-Experimenten zugeführt werden, um die Verteilung der einzelnen Varianten genau zu untersuchen. Vor dem Hintergrund, dass PKP3 eine differentielle Rolle bei der Tumorgenese spielt, sollten speziell Tumorgewebe genutzt werden, und diese mit geeigneteren Reagenzien untersucht werden. Besonders interessant ist die Frage, ob es während der Entartung der Zellen zu Veränderungen in der Expression oder Lokalisation der Varianten von PKP3 kommt. Um die Gewebespezifität weiter zu untersuchen, könnten monoklonale Antikörper hergestellt werden, die spezifisch an PKP3a beziehungsweise PKP3b binden. Dies wurde angegangen, führte bisher aber noch nicht zu verwertbaren Ergebnissen.

Aber auch die zellbiologische Rolle der neuen PKP3-Variante sollte untersucht werden, da auch für andere junctionale Proteine wie zum Beispiel p120^{CTN} eine veränderte Funktion der Isoformen beschrieben wurde [99]. Hier sind besonders die weiteren zellulären Prozesse interessant, bei denen Plakophiline eingebunden sind, wie beispielsweise die Translationskontrolle. Es wurde beschrieben, dass PKP3a möglicherweise auf Grund seiner Basizität an RNA-Moleküle binden kann [10]. PKP3b als stärker basisches Protein könnte somit ebenfalls diese passive Bindungsfähigkeit besitzen und daher eine wichtige Rolle im Translationsprozess spielen.

Wichtige Bindungsdomänen an Keratine, wie Cytokeratin 18 oder die desmosomalen Proteine Desmoplakin, Desmoglein und Desmocollin und konservierte Sequenzen wie die funktionellen Domänen HR2 und die *arm-repeats* von PKP3 bleiben von den Veränderungen unberührt. Somit kann die neue Variante potentiell voll funktionsfähig in die Desmosomen integriert werden und könnte auch als zytoplasmatischer Interaktionspartner diverser Enzyme fungieren. Da jedoch hier die Bindedomänen noch nicht hinreichend geklärt worden sind, lässt sich keine abschließende Aussage hierzu treffen [24, 34-35, 38, 42, 62, 94]. Die Bindung an

CK18 findet zum Beispiel unabhängig von der HR2-Domäne statt [10]. Daher könnte sich der veränderte aminoterminaler Anteil des PKP3b auf die Bindungsstärke des Proteins auswirken. Unsere Ergebnisse zeigen eine verstärkte Lokalisation des PKP3b in Desmosomen-typischer Lage im Gegensatz zu zytoplasmatischen Anteilen (Abb. 4-17; Abb. 4-18). Dieses könnte dem neuen Anteil der Variante geschuldet sein. Die beiden unterschiedlichen aminoterminalen Sequenzen der Varianten könnten zum Beispiel in Protein-Interaktions-*Assays*, wie dem *Two-Hybrid-Screen* eingesetzt werden, um festzustellen, ob und welche Proteine hier spezifisch an die jeweiligen Varianten binden und ob dies eine Änderung der zellbiologischen Funktion der Varianten mit sich bringt.

In diesem Zuge könnte analog zu Arbeiten von Valadares-Ayerbes et al. [98], die PKP3 als möglichen Biomarker für eine Colonkarzinomnachweis postulieren, überprüft werden, wie sich die bekannte Variante zur neuen Variante im Blut verhält. Differenzen beider Varianten könnten neue Möglichkeiten zur diagnostischen Nutzung darstellen.

6 Zusammenfassung

Desmosomen sind plaquehaltige und Intermediärfilament-verankernde Zell-Adhäsionsstrukturen, die vor allem in Geweben zu finden sind, die mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind, wie z.B. der menschlichen Haut.

Plakophilin 3 gehört zu einer Gruppe von drei verwandten desmosomalen Plaque-Proteinen (PKP1 – PKP3), welche gewebespezifisch exprimiert werden. Neben der Desmosom-assoziierten Adhärenzfunktion sind für die Plakophiline zusätzliche Funktionen in der Regulation der Proteinbiosynthese beschrieben. PKP3 spielt außerdem eine Rolle bei der Tumorentstehung. Abhängig vom Karzinom-Typ fungiert PKP3 entweder als Tumorsuppressor oder als Onkogen. Während jeweils 2 Spleißvarianten für PKP1 und PKP2 beschrieben worden sind, konnte für PKP3 bisher keine weitere Isoform nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde eine neue Variante von PKP3 identifiziert und in Analogie zu PKP1 und 2 als PKP3b bezeichnet. Die neue Variante unterscheidet sich durch ein neues Exon-1, das ca. 1600 bp vor dem ersten bislang bekannten Exon liegt. Das neu identifizierte Exon von PKP3b wird in den kodierenden Bereich der bekannten Variante PKP3a gespleißt. Die mRNA von PKP3b wurde in dieser Arbeit molekularbiologisch in Gesamtzell-mRNAs verschiedener Zelllinien beschrieben. Das 5'-Ende der mRNA von PKP3b wurde mittels einer modifizierten RACE-Methode identifiziert. Die PKP3b-mRNA verfügt über einen eigenen Translationsstart und unterscheidet sich damit in den ersten 112 Nukleotiden von PKP3a und kodiert für ein 812 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 88.655 Da. Die ersten 27 Aminosäuren von PKP3b beziehungsweise die ersten 12 Aminosäuren von PKP3a sind für die einzelnen Varianten charakteristisch, wohingegen die übrige Sequenz identisch ist.

Des Weiteren wurden polyklonale Antiseren gegen PKP3a und PKP3b hergestellt, aufgereinigt und für den immunbiochemischen, immunzyto- und immunhistochemischen Nachweis beider Varianten verwendet. Die Existenz des PKP3b-Proteins konnte in Immunfluoreszenz-mikroskopischen Analysen von Zelllinien aus mehrschichtigen Epithelien (HaCaT, A431) in Desmosomentypischer Lokalisation nachgewiesen werden. In Zelllinien aus einschichtigen Epi-

thelien ließ sich wenig (MCF-7, HT-29) bis kein PKP3b nachweisen (CaCo-2, A549). Analog zu den Zellkulturergebnissen konnten in verschiedenen humanen Geweben und Tumoren Immunfluoreszenz-mikroskopisch beide Varianten nachgewiesen werden, wobei PKP3b vor allem in mehrschichtigen Epithelien exprimiert wird.

Die Ergebnisse zeigen eine gegenüber der bekannten Variante PKP3a differentielle Expression der neu identifizierten Variante PKP3b in verschiedenen epithelialen Zelltypen auf. Spezifische Promoter-Bindungsstellen untermauern eine eigene Regulation der PKP3b Variante und könnten das abweichende Expressionsmuster erklären. Ob im Zuge der Entartung von Epithelzellen in der Zellkultur die Expression beeinflusst wird, konnte bisher nicht geklärt werden.

Weiterführende Untersuchungen werden der Suche nach spezifischen Protein-Interaktionspartner von PKP3b und dem veränderten Expressionsprofil nachgehen und damit letztlich die funktionelle Bedeutung von PKP3b klären.

Schlüsselwörter: Plakophilin 3, Desmosom, RACE, Variante, Epithelien, Tumorentstehung

7 Summary

Desmosomes are plaque containing adhesion structures of the cell, anchoring intermediate filaments. They are mostly found in tissues, which are prone to mechanical stress, e.g. the human skin. Plakophilin 3, family member of the desmosomal plaque proteins PKP1 – 3, which are expressed in a tissue specific manner, inherits not only the adherent function in desmosomes, but also additional functions in regulation of protein biosynthesis and tumorigenesis. It acts as a tumor suppressor or an oncogene, depending on carcinoma type. At present, 2 different splice variants are described for PKP1 and 2, while none are known for PKP3.

In this thesis, a novel variant of PKP3 was identified, designated as PKP3b in analogy to PKP1 and PKP2. This variant differs from the known PKP3 (PKP3a) due to a newly identified exon positioned about 1600 bp upstream of the known exon1. This novel exon-1 is spliced into the coding sequence of PKP3a. The resulting mRNA was characterized on molecular level including the completion of the 5'-end by a modified RACE method. Bearing a distinct translation start, the mRNA of PKP3b differs within the first 112 nucleotides as compared to PKP3a, thereby coding for a protein of 812 amino acids (AA) with a calculated molecular mass of 88.655 Da. The first 27 AA of PKP3b and respectively the first 12 of PKP3a are unique for each of them, while the remaining sequence of both variants is identical.

Polyclonal antisera against PKP3a and 3b were generated and purified and used in immunobiochemical, immuncyto- and immunohistochemical analyses of both variants. Immunofluorescence microscopy demonstrated the expression of PKP3b in cell lines derived from multi-layered epithelia (HaCat, A431), here in typical desmosomal localization. Cell lines from single layered epithelia showed less (MCF-7, HT-29) or no PKP3b (CaCo-2, A549) expression.

Similar to the results in cell cultures, both variants were identified in immunofluorescence analyses on tissue sections of different human tissues und tumors where PKP3b is particularly expressed in stratified epithelia.

The results demonstrate a differential expression of PKP3b in various cell types in comparison to PKP3a. Identification of specific promoter elements substantiates

an independent regulation of the *PKP3b* variant, which might explain the differential expression pattern of both proteins. Whether the varying expression of PKP3b in some malignant transformed cell lines is altered during cell culture has to be evaluated in future experiments.

Further experiments have to address specific interaction partners of PKP3b and the distinct expression profile, thereby resolving the functional role of PKP3b.

Key words: Plakophilin 3, desmosome, RACE, variant, epithelia, tumorigenesis

8 Literaturverzeichnis

1. Aigner, K., et al., *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression*. FEBS Lett, 2007. **581**(8): p. 1617-24.
2. Anderson, J.M., C.M. Van Itallie, and A.S. Fanning, *Setting up a selective barrier at the apical junction complex*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(2): p. 140-5.
3. Arbabi, S., et al., *Epithelial cyclooxygenase-2 expression: a model for pathogenesis of colon cancer*. J Surg Res, 2001. **97**(1): p. 60-4.
4. Armstrong, D.K., et al., *Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(1): p. 143-8.
5. Balasubramanian, S. and R.L. Eckert, *Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis--differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **224**(3): p. 214-9.
6. Bierkamp, C., et al., *Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin*. Dev Biol, 1996. **180**(2): p. 780-5.
7. Birchmeier, W., *E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene*. Bioessays, 1995. **17**(2): p. 97-9.
8. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
9. Black, D.L., *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 291-336.
10. Bonn  , S., et al., *Defining desmosomal plakophilin-3 interactions*. J Cell Biol, 2003. **161**(2): p. 403-16.
11. Bonn  , S., et al., *Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 14): p. 2265-76.
12. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
13. Boussadia, O., et al., *E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland*. Mech Dev, 2002. **115**(1-2): p. 53-62.
14. Brembeck, F.H., M. Rosario, and W. Birchmeier, *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(1): p. 51-9.
15. Breuninger, S., et al., *Desmosomal plakophilins in the prostate and prostatic adenocarcinomas: implications for diagnosis and tumor progression*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2509-19.
16. Browne, G., A.E. Sayan, and E. Tulchinsky, *ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer*. Cell Cycle, 2010. **9**(5): p. 886-91.

17. Chen, X., et al., *Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling.* J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10512-22.
18. Cheng, X. and P.J. Koch, *In vivo function of desmosomes.* J Dermatol, 2004. **31**(3): p. 171-87.
19. Chidgey, M. and C. Dawson, *Desmosomes: a role in cancer?* Br J Cancer, 2007. **96**(12): p. 1783-7.
20. Choi, H.J. and W.I. Weis, *Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1.* J Mol Biol, 2005. **346**(1): p. 367-76.
21. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Desmosomal interactome in keratinocytes: a systems biology approach leading to an understanding of the pathogenesis of skin disease.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3517-33.
22. d'Ambrosio, E. and A.V. Furano, *DNA synthesis arrest sites at the right terminus of rat long interspersed repeated (LINE or L1Rn) DNA family members.* Nucleic Acids Res, 1987. **15**(7): p. 3155-75.
23. Dusek, R.L., L.M. Godsel, and K.J. Green, *Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion.* J Dermatol Sci, 2007. **45**(1): p. 7-21.
24. Eisenhardt, M., *Identifizierung der Bindung des desmosomalen Plaqueproteins PKP3 mit den ribosomalen Translationsfaktoren eIF6 und RACK1*, in *Institut für Pathologie*. 2008, Philipps-Universität Marburg: Marburg.
25. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Cell junctions in amphibian skin.* J Cell Biol, 1965. **26**(1): p. 263-91.
26. Furukawa, C., et al., *Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer.* Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7102-10.
27. Gallicano, G.I., C. Bauer, and E. Fuchs, *Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature.* Development, 2001. **128**(6): p. 929-41.
28. Gallicano, G.I., et al., *Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage.* J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 2009-22.
29. Gerull, B., et al., *Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.* Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1162-4.
30. Gosavi, P., et al., *E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly.* Cell Mol Life Sci, 2010.
31. Green, K.J. and C.L. Simpson, *Desmosomes: new perspectives on a classic.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2499-515.
32. Grossmann, K.S., et al., *Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation.* J Cell Biol, 2004. **167**(1): p. 149-60.
33. Gruber, A.R., et al., *The Vienna RNA websuite.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W70-4.
34. Hainz, N., *In vivo Charakterisierung von Interaktionen in vitro gefundener Bindungspartner mit dem desmosomalen Plaqueprotein Plakophilin 3 (Pkp3)*, in *Institut für Pathologie*. 2007, Philipps-Universität: Marburg.

35. Hartig, C., *Funktionelle Charakterisierung von in-vitro Interaktionspartnern des desmosomalen Plaqueproteins Plakophilin 3 (PKP3)*, in *Institut für Pathologie*. 2007, Philipps-Universität Marburg: Marburg.
36. Hatzfeld, M., *The armadillo family of structural proteins*. *Int Rev Cytol*, 1999. **186**: p. 179-224.
37. Hatzfeld, M., *The p120 family of cell adhesion molecules*. *Eur J Cell Biol*, 2005. **84**(2-3): p. 205-14.
38. Hatzfeld, M., *Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?* *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(1): p. 69-77.
39. Hatzfeld, M., et al., *The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization*. *J Cell Biol*, 2000. **149**(1): p. 209-22.
40. Heid, H.W., et al., *Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein)*. *Differentiation*, 1994. **58**(2): p. 113-31.
41. Herren, T., P.A. Gerber, and F. Duru, *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations*. *Clin Res Cardiol*, 2009. **98**(3): p. 141-58.
42. Hofmann, I., et al., *Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(3): p. 1388-98.
43. Hofmann, I., et al., *Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 13): p. 2471-83.
44. Jonkman, M.F., et al., *Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa*. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**(4): p. 653-60.
45. Kedersha, N. and P. Anderson, *Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 963-9.
46. Kimura, K., et al., *Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes*. *Genome Res*, 2006. **16**(1): p. 55-65.
47. Klymkowsky, M.W., *Plakophilin, armadillo repeats, and nuclear localization*. *Microsc Res Tech*, 1999. **45**(1): p. 43-54.
48. Koch, P.J. and W.W. Franke, *Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(5): p. 682-7.
49. Kottke, M.D., E. Delva, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome: cell science lessons from human diseases*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 5): p. 797-806.
50. Kowalczyk, A.P., et al., *Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments*. *Int Rev Cytol*, 1999. **185**: p. 237-302.
51. Kundu, S.T., et al., *Plakophilin3 downregulation leads to a decrease in cell adhesion and promotes metastasis*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(10): p. 2303-14.
52. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

53. Lai Cheong, J.E., V. Wessagowit, and J.A. McGrath, *Molecular abnormalities of the desmosomal protein desmoplakin in human disease*. Clin Exp Dermatol, 2005. **30**(3): p. 261-6.
54. Lambert, J., et al., *Serum plakophilin-3 autoreactivity in paraneoplastic pemphigus*. Br J Dermatol, 2010. **163**(3): p. 630-2.
55. McGrath, J.A., *Inherited disorders of desmosomes*. Australas J Dermatol, 2005. **46**(4): p. 221-9.
56. McGrath, J.A., et al., *Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 240-4.
57. McGrath, J.A. and V. Wessagowit, *Human hair abnormalities resulting from inherited desmosome gene mutations*. Keio J Med, 2005. **54**(2): p. 72-9.
58. McKoy, G., et al., *Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease)*. Lancet, 2000. **355**(9221): p. 2119-24.
59. Mertens, C., et al., *Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7795-800.
60. Mertens, C., C. Kuhn, and W.W. Franke, *Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1009-25.
61. Mese, G., G. Richard, and T.W. White, *Gap junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2516-24.
62. Monz, M., *Charakterisierung der Interaktionen zwischen dem Desmosomalne Plakophilin 3 und den glykolytischen Enzymen Aldolase A und Triosephosphatisomerase I*, in Institut für Pathologie. 2010, Philipps-Universität: Marburg. p. 109.
63. Müller, J., et al., *Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate*. EMBO J, 2003. **22**(17): p. 4431-42.
64. Nemeth, Z.H., et al., *Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells*. Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 987-96.
65. Neuber, S., et al., *The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family*. Dermatol Res Pract, 2010. **2010**: p. 101452.
66. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
67. Nilsen, T.W. and B.R. Graveley, *Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing*. Nature, 2010. **463**(7280): p. 457-63.
68. Nuber, U.A., et al., *The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes*. Eur J Cell Biol, 1995. **66**(1): p. 69-74.
69. Papagerakis, S., et al., *Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters*. Hum Pathol, 2003. **34**(6): p. 565-72.
70. Paris, L., et al., *Structural organization of the tight junctions*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 646-59.

71. Payne, A.S., et al., *Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(5): p. 536-43.
72. Peifer, M., S. Berg, and A.B. Reynolds, *A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles*. Cell, 1994. **76**(5): p. 789-91.
73. Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs, *Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, 2003. **112**(4): p. 535-48.
74. Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
75. Reed, R. and T. Maniatis, *A role for exon sequences and splice-site proximity in splice-site selection*. Cell, 1986. **46**(5): p. 681-90.
76. Ruiz, P., et al., *Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart*. J Cell Biol, 1996. **135**(1): p. 215-25.
77. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(1): p. 1-26.
78. Schäfer, S., P.J. Koch, and W.W. Franke, *Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins*. Exp Cell Res, 1994. **211**(2): p. 391-9.
79. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 151-66.
80. Schmidt, A., et al., *Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage*. Eur J Cell Biol, 1994. **65**(2): p. 229-45.
81. Schmidt, A. and S. Jäger, *Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus?* Eur J Cell Biol, 2005. **84**(2-3): p. 189-204.
82. Schmidt, A., et al., *Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein*. Differentiation, 1999. **64**(5): p. 291-306.
83. Schmidt, A., et al., *Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components*. Cell Tissue Res, 1997. **290**(3): p. 481-99.
84. Schnoor, M., et al., *Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(3): p. 867-72.
85. Schwarz, J., et al., *Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation*. Hum Pathol, 2006. **37**(5): p. 613-22.
86. Shi, X. and D.L. Jarvis, *A new rapid amplification of cDNA ends method for extremely guanine plus cytosine-rich genes*. Anal Biochem, 2006. **356**(2): p. 222-8.
87. Sklyarova, T., et al., *Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(6): p. 1375-85.
88. Smith, C., et al., *Regulation of desmocollin gene expression in the epidermis: CCAAT/enhancer-binding proteins modulate early and late*

- events in keratinocyte differentiation. *Biochem J*, 2004. **380**(Pt 3): p. 757-65.
89. Sobolik-Delmaire, T., D. Katafiasz, and J.K. Wahl, 3rd, *Carboxyl terminus of Plakophilin-1 recruits it to plasma membrane, whereas amino terminus recruits desmoplakin and promotes desmosome assembly*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(25): p. 16962-70.
 90. Sommers, C.L., et al., *Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines*. *Cancer Res*, 1992. **52**(19): p. 5190-7.
 91. South, A.P., *Plakophilin 1: an important stabilizer of desmosomes*. *Clin Exp Dermatol*, 2004. **29**(2): p. 161-7.
 92. South, A.P., et al., *Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 16): p. 3303-14.
 93. Stanley, J.R. and M. Amagai, *Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(17): p. 1800-10.
 94. Stöckmann, L., *Interaktionsanalyse der Proteine ARPC4, PIN1 und GAPDH mit dem desmosomalen Plaqueprotein Plakophilin 3 (PKP3)*, in *Institut für Pathologie*. 2009, Philipps-Universität Marburg. p. 138.
 95. Suzuki, Y. and S. Sugano, *Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method*. *Methods Mol Biol*, 2003. **221**: p. 73-91.
 96. Syrris, P., et al., *Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. *Circulation*, 2006. **113**(3): p. 356-64.
 97. Thiery, J.P., *Cell adhesion in development: a complex signaling network*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(4): p. 365-71.
 98. Valladares-Ayerbes, M., et al., *Evaluation of plakophilin-3 mRNA as a biomarker for detection of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer patients*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(6): p. 1432-40.
 99. van Hengel, J. and F. van Roy, *Diverse functions of p120ctn in tumors*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(1): p. 78-88.
 100. van Tintelen, J.P., et al., *Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. *Circulation*, 2006. **113**(13): p. 1650-8.
 101. Vanbokhoven, H., et al., *p63, a story of mice and men*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(6): p. 1196-207.
 102. Vinken, M., et al., *Connexins and their channels in cell growth and cell death*. *Cell Signal*, 2006. **18**(5): p. 592-600.
 103. Weis, W.I. and W.J. Nelson, *Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(47): p. 35593-7.
 104. Weiske, J., et al., *The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p. 41175-81.
 105. White, T.W. and D.L. Paul, *Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: p. 283-310.
 106. Wratten, D., *Charakterisierung eines alternativen Promotors des menschlichen Plakophilin 3-Gens*, in *Institut für Pathologie*. 2009, Philipps-Universität Marburg: Marburg.

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren und Dozenten:

Albert	Herzum	Lohoff
Aumüller	Hofmann	Löffler
Bachmann	Hörle	Maier
Barth	Hoyer	Maisch
Baum	Hundt	Maisner
Baumann	Janckowski-	Mennel
Basler	Dohrmann	Michl
Brehm	Jäkel	Moll
Cetin	Jeck	Moosdorf
Christiansen	Kalder	Müller
Czubayko	Kalinowsky	Mutters
Daut	Kanngiesser	Neubauer
Duda	Kann	Nimphius
Eberhardt	Kill	Neumüller
Ellenrieder	Kiriazidis	Oertel
Eming	Klose	Olbert
Feuser	Köhler	Pagenstecher
Geks	König	Plant
Gerdes	Koolmann	Ramaswamy
Glorius	Krebber	Renz
Gress	Kroll	Richter
Grundmann	Kruse	Rothmund
Grzeschik	Kuhnert	Röhm
Hasilik	Kühne	Rölleke
Hegele	Lemke	Rominger
Hermann-Lingen	Lill	Röper
Hertl	Leonhardt	Ruchholtz

Schierl
Schlosser
Schmidt
Schneider
Sönnichsen
Schu
Seitz
Sommer
Steiniger
Sure
Suske
Tackenberg
Teymoortash
Vogelmeier
Wagner
Waldegger
Waldmann
Weihe
Werner
Westermann
Wilhelm
Wulf
Zemlin
Zettl
Ziering

10 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. R. Moll für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die wissenschaftliche Betreuung dieser.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. G. Schratt für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ansgar Schmidt, der mit seiner herzlichen Art und unermüdlichen Geduld diese Arbeit möglich gemacht hat. Ein Mensch, der zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und auch in scheinbar ausweglosen Situationen immer noch einen Hoffnungsschimmer gesehen hat. Ohne ihn, seine Unterstützung und seinen reichhaltigen Erfahrungsschatz wäre unser Projekt nicht das geworden, was es heute ist. Danke Ansgar!

Für die technische Unterstützung und die Weitergabe ihrer Erfahrungswerte möchte ich Frau Viktoria Morokina sowie Frau Sabine Koch danken.

Bei Denise Ditthardt und Steffen Neuber möchte ich mich bedanken für kurzweilige Momente während der manchmal langwierigen Versuche und konstruktive, anregende Gespräche.

Das Schlusswort gehört wohl meiner Familie und meiner Partnerin, die es nie müde wurden, sich meine Gedanken und Bedenken, meine Erfolge und Misserfolge im Rahmen dieser Dissertation anzuhören und von einem ganz anderen Standpunkt aus zu betrachten. Dieser nötige Abstand hat mir immer wieder neue Motivation und Unterstützung gegeben.